



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Rita Margarida Pinto Figueiredo

**ESTUDO DE UM PRODUTO COSMÉTICO ANTIRRUGAS
UTILIZANDO PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DA PELE
COM RECURSO A TÉCNICAS NÃO-INVASIVAS**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Paulo Costa e da Mestre Marta Ferreira

Outubro, 2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO/TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Costa, no papel de Orientador da presente dissertação, pela excelente orientação científica, a sempre disponibilidade, amizade e o apoio desde o início.

À Mestre Marta Ferreira, no papel de Co-Orientadora da presente dissertação, por acreditar sempre que tudo é possível e pela visão que levou à concretização deste trabalho, bem como por todos os conhecimentos que partilhou comigo.

Ao Dr. Nuno Menezes, Médico Dermatologista especialista em microscopia confocal, pela disponibilidade, a sempre boa disposição e alegria, que tornaram a recolha de imagens com o microscópio confocal uma tarefa muito mais fácil.

Ao Dr. Armando Baptista, Diretor do Serviço de Dermatologia e Venereologia do Centro Hospitalar de Gaia/Espinho, que autorizou a utilização do microscópio confocal deste serviço.

Ao Giuseppe Solomita, Diretor Internacional de Vendas da MAVIG GmbH, que desde que manifestei interesse em utilizar o microscópio confocal neste trabalho se ofereceu para me prestar todo o apoio possível incluindo a cedência de material didático e uma licença gratuita do *software* Confoscan.

À Rozenn Barrois, Gerente da Área de Vendas da Sederma, por ter permitido a utilização do ingrediente ativo Matrixyl® Synthe'6™ neste trabalho.

À Raphaëla Kästle e à Irene Solakiewicz da MAVIG GmbH, que me enviaram a licença do *software* Confoscan e me prestaram apoio durante a utilização do mesmo.

À DS produtos químicos e à Comercial Quimica Jover pelo envio de amostras para a produção do produto teste utilizado neste estudo.

A todas as voluntárias que participaram neste estudo, sem as quais não teria sido possível realizar a presente dissertação.

À minha mãe que sempre me apoiou e incentivou, em especial nos momentos de desânimo.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos!

Resumo

O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo que se manifesta na aparência, estrutura e função de barreira da pele. A possibilidade de retardar ou atenuar os sinais do envelhecimento cutâneo tem levado a uma grande pesquisa tanto na dermatologia como na cosmética, tendo sido produzidos, ao longo dos últimos anos, inúmeros produtos e compostos químicos com este objetivo.

Existem várias categorias de ingredientes ativos usados nesta área, como por exemplo vitaminas e antioxidantes, hormonas, alfa e beta-hidroxiácidos e péptidos. Estes últimos relativamente recentes e com alguma popularidade.

Neste estudo foi avaliada, *in vivo*, a eficácia de um péptido de sinalização, o Palmitoil-KMO₂K, que havia demonstrado, em estudos prévios, a capacidade de *in vitro* estimular a síntese de moléculas da derme, como o colagénio tipo I, colagénio tipo III, colagénio tipo IV, fibronectina e ácido hialurónico, e da epiderme como as lamininas e a fibronectina.

Para avaliação da eficácia 26 voluntárias aplicaram um creme contendo 2% de Matrixyl® Synthe'6™, o equivalente a 5 ppm do péptido Palmitoil-KMO₂K, em todo o rosto, duas vezes por dia, durante 2 meses. Avaliações, utilizando diferentes técnicas biométricas não invasivas, foram realizadas no início do estudo, um mês e dois meses após a utilização do produto teste. Estas permitiram avaliar o efeito deste produto nas propriedades mecânicas e no relevo da pele, bem como observar a derme e avaliar de forma quantitativa as alterações aí ocorridas.

No final do estudo não foi possível comprovar o efeito do péptido de sinalização Palmitoil-KMO₂K ao nível da síntese de colagénio na derme nem demonstrar grandes melhorias cutâneas nos sinais de envelhecimento. Há evidências de que este péptido tenha efeito *in vitro* no entanto não há evidências de que ele alcance a derme numa concentração efetiva, após aplicação na superfície da pele.

Este estudo permitiu demonstrar que é possível avaliar a eficácia de produtos cosméticos ao longo do tempo, não só ao nível da superfície da pele mas também ao nível das camadas inferiores, oferecendo assim a possibilidade da sua visualização, sem recurso a métodos invasivos. Todas as técnicas biométricas utilizadas neste trabalho demonstraram ser bem toleradas *in vivo* e permitiram oferecer diferentes tipos de informação.

Palavras-chave: envelhecimento cutâneo, Palmitoil-KMO₂K, Cutometer®, PRIMOS™, microscopia confocal.

Abstract

Skin aging is a complex biological process which is manifested in the skin appearance, structure and barrier function. The possibility of delay or reduce the signs of skin aging has led to an extensive research in dermatology and cosmetology. Over the past few years, many products and chemical compounds have been developed with this purpose.

There are several classes of active ingredients used in this field, such as vitamins and antioxidants, hormones, alpha and beta-hydroxy acids and peptides. This latter class is relatively recent and with some popularity in this area.

In this study it was evaluated the *in vivo* efficacy of a signal peptide, the Palmitoyl-KMO₂K peptide, which had demonstrated, in previous *in vitro* studies, the ability of stimulate the synthesis of dermal molecules such as collagen type I, collagen type III, collagen type IV, fibronectin and hyaluronic acid, and epidermal molecules such as the laminin and fibronectin.

For efficacy evaluation, 26 female volunteers applied a cream containing 2% Matrixyl® Synthe'6™, equivalent to 5 ppm of the peptide Palmitoyl-KMO₂K, on the face, twice a day for two months. Assessments using different noninvasive biometric techniques were performed at beginning of the study and one and two months after. The biometric techniques used made possible to evaluate the effect of the test product on mechanical properties and in the relief of the skin as well as observe the dermis and evaluate quantitatively the changes there occurred.

At the end of the study, it was not possible to prove the efficacy of the signal peptide Palmitoyl-KMO₂K in increasing collagen synthesis even in improving the skin signs of aging. There is evidence that this peptide has *in vitro* efficacy. However there is no evidence that an effective concentration could reach the dermis after their application on the skin surface.

This study has demonstrated that it is possible to evaluate the efficacy of cosmetic products over time, not only at skin surface but also at lower layers, offering the possibility of skin imaging without using invasive methods. All biometric techniques used in this work have shown that they are well tolerated *in vivo* and can provided different types of information.

Keywords: Skin aging, Palmitoil-KMO₂K, Cutometer®, PRIMOS™, confocal microscopy

Índice

| | |
|--|-------------|
| Índice..... | vi |
| Índice de tabelas | viii |
| Índice de figuras..... | xii |
| Abreviaturas | xv |
| 1 Introdução Geral | 1 |
| 1.1 Envelhecimento cutâneo | 2 |
| 1.2 Péptidos como ingredientes ativos usados em produtos cosméticos | 3 |
| 1.2.1 Palmitoil-KMO ₂ K | 5 |
| 1.3 Avaliação, quantificação e observação da pele | 6 |
| 1.3.1 Avaliação das propriedades mecânicas da pele..... | 6 |
| 1.3.2 Avaliação do relevo da pele | 8 |
| 1.3.3 Observação da pele | 10 |
| 1.4 Objetivo do trabalho | 13 |
| 2 Parte Experimental..... | 14 |
| 2.1 Materiais e Métodos..... | 15 |
| 2.1.1 Materiais | 15 |
| 2.1.2 Métodos..... | 17 |
| 2.2 Resultados..... | 30 |
| 2.2.1 Desenvolvimento de formulação | 30 |
| 2.2.2 Estudo de estabilidade..... | 31 |
| 2.2.3 Avaliação do efeito sobre as propriedades mecânicas da pele | 35 |
| 2.2.4 Avaliação do efeito sobre o relevo da pele | 39 |
| 2.2.5 Quantificação das fibras de colagénio e observação da pele em profundidade | 45 |
| 2.2.6 Correlações de todas as variáveis | 51 |
| 2.3 Discussão | 54 |
| 2.4 Conclusão..... | 64 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | Referências bibliográficas..... | 66 |
| 4 | Anexos..... | 71 |
| | ANEXO I – Questionário de Recrutamento | 72 |
| | ANEXO II – Instruções dadas às voluntárias..... | 73 |
| | ANEXO III – Consentimento Informado..... | 74 |
| | ANEXO IV – Ficha de registo de medições: Cutometer® e PRIMOS™ | 75 |
| | ANEXO V – Ficha de registo de medições: Microscópio confocal..... | 76 |
| | ANEXO VI – Estatística descritiva e testes de normalidade | 77 |
| | ANEXO VII – Testes estatísticos..... | 79 |
| | Glossário | 80 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Exemplos de alguns parâmetros de rugosidade obtidos com equipamento PRIMOS™..... | 10 |
| Tabela 2 – Matérias-primas usadas durante a fase de desenvolvimento de formulação..... | 15 |
| Tabela 3 – Composição do ingrediente cosmético Matrixyl® Synthe'6™..... | 16 |
| Tabela 4 – Composição qualitativa e quantitativa do creme base..... | 16 |
| Tabela 5 – Fórmula e modo de preparação do creme base para estudos de estabilidade..... | 17 |
| Tabela 6 – Especificações do creme base..... | 18 |
| Tabela 7 – Fórmula e modo de preparação do produto teste..... | 19 |
| Tabela 8 – Composição das diferentes fórmulas testadas durante a fase de desenvolvimento de formulação..... | 30 |
| Tabela 9 – Diferentes fragrâncias testadas..... | 31 |
| Tabela 10 – Resultados da avaliação das características organoléticas da amostra de creme base submetida a estudos de estabilidade..... | 32 |
| Tabela 11 – Parâmetros reológicos do creme base ao longo do estudo de estabilidade..... | 35 |
| Tabela 12 – Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o parâmetro R0 (n = 26). | 36 |
| Tabela 13 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o parâmetro R5 (n = 26). | 37 |
| Tabela 14 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o parâmetro R7 (n = 26). | 38 |
| Tabela 15 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o volume das cavidades (n = 26). | 39 |
| Tabela 16- Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a rugosidade aritmética (Ra) (n = 26)..... | 40 |
| Tabela 17 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a profundidade das rugas (n = 26)..... | 42 |

| | |
|---|----|
| Tabela 18 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o perímetro médio dos “objetos” analisados (fibras de colagénio) (n = 26). | 46 |
| Tabela 19 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a área média dos “objetos” analisados (fibras de colagénio) (n = 26). | 47 |
| Tabela 20 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a o Índice de fragmentação A (n = 26). | 48 |
| Tabela 21 – Correlações entre os diversos parâmetros obtidos com os equipamentos Cutometer® MPA 580, PRIMOS™ premium e VivaScope® 1500 antes do início do estudo e, respetivas representações gráficas. | 51 |
| Tabela 22 – Correlações entre as diferenças antes e após o estudo dos diferentes parâmetros obtidos com os equipamentos Cutometer® MPA 580, PRIMOS™ premium e VivaScope® 1500 e, respetivas representações gráficas. | 52 |
| Tabela 23 - Estatística descritiva para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada à temperatura ambiente. | 78 |
| Tabela 24 - Testes de normalidade para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada à temperatura ambiente. | 78 |
| Tabela 25 - Estatística descritiva para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada a 40°C. | 79 |
| Tabela 26 - Testes de normalidade para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada a 40°C. | 79 |
| Tabela 27 - Estatística descritiva para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s ⁻¹ da amostra armazenada à temperatura ambiente. | 80 |
| Tabela 28 – Testes de normalidade para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s ⁻¹ da amostra armazenada à temperatura ambiente. | 81 |
| Tabela 29 - Estatística descritiva para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s ⁻¹ da amostra armazenada a 40°C. | 81 |
| Tabela 30 - Testes de normalidade para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s ⁻¹ da amostra armazenada a 40°C. | 82 |
| Tabela 31 – Estatística descritiva para as diferenças do parâmetro R0. | 82 |
| Tabela 32 – Testes de normalidade para as diferenças do parâmetro R0. | 83 |
| Tabela 33 – Estatística descritiva para o parâmetro R5. | 83 |
| Tabela 34 – Testes de normalidade para os resultados do parâmetro R5. | 84 |
| Tabela 35 - Estatística descritiva para as diferenças do parâmetro R7. | 85 |
| Tabela 36 - Testes de normalidade para as diferenças do parâmetro R7. | 85 |

| | |
|--|----|
| Tabela 37 - Estatística descritiva para os valores do volume das cavidades..... | 86 |
| Tabela 38 – Testes de normalidade para os resultados do volume das cavidades. | 87 |
| Tabela 39 - Estatística descritiva para as diferenças da rugosidade aritmética (Ra). | 87 |
| Tabela 40 - Testes de normalidade para as diferenças da rugosidade aritmética (Ra)..... | 88 |
| Tabela 41 - Estatística descritiva para os valores da profundidade das rugas..... | 88 |
| Tabela 42 - Testes de normalidade para os resultados da profundidade das rugas. | 89 |
| Tabela 43 - Estatística descritiva para as diferenças do perímetro dos “objetos” analisados..... | 89 |
| Tabela 44 – Testes de normalidade para as diferenças do perímetro dos “objetos” analisados..... | 90 |
| Tabela 45 - Estatística descritiva para as diferenças da área dos “objetos” analisados..... | 90 |
| Tabela 46 - Testes de normalidade para as diferenças da área dos “objetos” analisados..... | 91 |
| Tabela 47 - Estatística descritiva para o Índice de fragmentação A..... | 91 |
| Tabela 48 – Testes de normalidade para o Índice de fragmentação A. | 92 |
| Tabela 49 - Teste t de <i>Student</i> para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada à temperatura ambiente..... | 80 |
| Tabela 50 - Teste t de <i>Student</i> para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada a 40°C. | 80 |
| Tabela 51 - Resumo dos testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon, amostras emparelhadas) para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s ⁻¹ da amostra armazenada à temperatura ambiente..... | 80 |
| Tabela 52 - Teste t de <i>Student</i> de amostras em pares para os valores de viscosidade velocidade de deformação em corte 5,027 s ⁻¹ da amostra armazenada a 40°C..... | 81 |
| Tabela 53 – Teste t de <i>Student</i> para as diferenças do parâmetro R0..... | 81 |
| Tabela 54 – Resumo dos testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon, amostras emparelhadas) para os valores do parâmetro R5..... | 81 |
| Tabela 55 - Teste t de <i>Student</i> para as diferenças do parâmetro R7..... | 82 |
| Tabela 56 - Teste t de <i>Student</i> de amostras em pares para os valores do volume das cavidades. | 82 |
| Tabela 57 - Teste t de <i>Student</i> para as diferenças da rugosidade aritmética. | 82 |

| | |
|---|----|
| Tabela 58 - Teste t de <i>Student</i> de amostras em pares para os valores da profundidade das rugas..... | 83 |
| Tabela 59 - Teste t de <i>Student</i> as diferenças do perímetro dos “objetos” analisados. | 83 |
| Tabela 60 - Teste t de <i>Student</i> para as diferenças da dos “objetos” analisados. | 83 |
| Tabela 61 - Resumo dos testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon, amostras emparelhadas) para o Índice de fragmentação A. | 84 |

Índice de figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1 – Esquema gráfico de uma deformação cutânea obtida pelo método de sucção. | 8 |
| Figura 2 – Ilustração da distorção de um padrão de linhas projetado num rosto humano. | 9 |
| Figura 3 – Esquema simplificado representativo do funcionamento do equipamento PRIMOS™ para medição do relevo cutâneo <i>in vivo</i> | 9 |
| Figura 4 – Esquema representativo do princípio da microscopia confocal. | 11 |
| Figura 5 – Esquema simplificado representativo do funcionamento de um microscópio confocal. | 12 |
| Figura 6 – Exemplificação do seccionamento ótico realizado com o microscópio confocal. | 13 |
| Figura 7 - Voluntária durante aquisição de imagens com o equipamento PRIMOS™. | 24 |
| Figura 8 - Voluntária durante aquisição de macrofotografias com o equipamento Visioface® 1000 D. | 25 |
| Figura 9 – Ilustração do modo de marcação do local a avaliar com microscópio confocal em cada voluntária. | 26 |
| Figura 10 – Anel de aço inoxidável (seta verde) com janela adesiva (seta vermelha) para fixação do microscópio confocal à pele. | 26 |
| Figura 11 – Voluntária durante aquisição de imagens com o microscópio confocal VivaScope® 1500. | 27 |
| Figura 12 – Ilustração de um “VivaCub” adquirida a uma profundidade de 30 µm. | 27 |
| Figura 13 – Imagem confocal do estrato córneo onde é possível visualizar o halo do anel de aço inoxidável usado para fixar o microscópio confocal à pele. | 28 |
| Figura 14 – Gráfico de barras com os resultados da avaliação do pH da amostra de creme base submetida a estudos de estabilidade. | 32 |
| Figura 15 – Reograma da amostra de creme base armazenada à temperatura ambiente. | 33 |
| Figura 16 – Reograma da amostra de creme base armazenada a 40°C. | 33 |
| Figura 17 – Gráfico de barras ilustrando a variação da viscosidade, à velocidade de deformação em corte 5,027 s⁻¹, do creme base ao longo do estudo de estabilidade. *p ≤ 0,05. | 34 |
| Figura 18 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do parâmetro R0 em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 19 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores do parâmetro R5 no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 36 |
| Figura 20 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do parâmetro R7 em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 38 |
| Figura 21 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores de volume das cavidades no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 39 |
| Figura 22 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do parâmetro Ra em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 40 |
| Figura 23 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores de profundidade das rugas no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 41 |
| Figura 24 – Fotografias da zona periocular designada de “pés de galinha” adquiridas com o equipamento PRIMOS™ de uma das voluntárias que apresentou diminuição da profundidade das rugas. | 43 |
| Figura 25 – Imagens 3D da zona periocular designada de “pés de galinha” adquiridas com o equipamento PRIMOS™ de uma das voluntárias que apresentou diminuição da profundidade das rugas. | 44 |
| Figura 26 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do perímetro dos “objetos” (fibras de colagénio) a em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 45 |
| Figura 27 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças da área dos “objetos” (fibras de colagénio) em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 46 |
| Figura 28 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores do Índice de fragmentação A (área) no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste. | 47 |
| Figura 29 – Imagem da zona periocular ao nível da derme obtida com o microscópio confocal. A) antes da aplicação do produto teste. B) dois meses após a aplicação do produto teste. | 48 |
| Figura 30 - Imagens da zona periocular ao nível da derme obtidas com o microscópio confocal e, após processamento com o <i>software</i> Confoscan indicando o nível de fragmentação antes e após o tratamento com o produto teste. | 49 |
| Figura 31 – Imagens confocais representativas de diferentes arquiteturas da matriz dérmica observadas em diferentes voluntárias que participaram no estudo. | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 32 – Estrutura química do péptido Palmitoil-Lisil-Dioximetionol-Lisina (Palmitoi-KMO ₂ K)..... | 61 |
|---|----|

Abreviaturas

FDH – Fibroblastos dérmicos humanos

GAGs – Glicosaminoglicanos

GHK – Tripéptido-1

HSP47 – *Heat Shock Protein 47*

JDE – Junção dermo-epidérmica

INCI – *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

Kg – Kilograma

KTTKS – lisina–treonina–treonina–lisina–serina

MMPs - Metaloproteinases da Matriz

mg – miligrama

ng - nanograma

Pal-KTTKS – Palmitoil-pentapéptido-4

ppm – Parte por milhão

PRIMOS - *Phase Shift Rapid Imaging Of Skin*

Ra – Rugosidade média aritmética

Rmax – Rugosidade máxima

Rt – rugosidade da pele

SNARE – *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors*

TGF- β – *Transforming Growth Factor Beta*

1 Introdução Geral

1.1 **Envelhecimento cutâneo**

O envelhecimento humano é um processo cronológico de declínio fisiológico que progride com o aumento da idade, afetando de forma variada os órgãos, tecidos e células (1). Os efeitos da idade manifestam-se na aparência, estrutura e função de barreira da pele razão pela qual, durante os últimos anos, muitos estudos têm sido realizados nesta área com objetivo de melhor compreender estes efeitos. O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo que pode ser classificado em *envelhecimento intrínseco* e *envelhecimento extrínseco*. O envelhecimento intrínseco é causado pela passagem do tempo e modulado por múltiplos fatores como o “*background*” genético e o encurtamento progressivo dos telômeros. O envelhecimento extrínseco resulta de exposições cumulativas da pele principalmente à radiação UV (ultravioleta) mas também a outros fatores externos como a poluição, o fumo do tabaco, movimentos repetitivos dos músculos, o estilo de vida, etc. e sobrepõe-se ao envelhecimento intrínseco (1-4).

Histologicamente, o envelhecimento cutâneo apresenta diferentes características ao nível da epiderme, derme e apêndices cutâneos. Na epiderme ocorre o achatamento da junção dermo-epidérmica (JDE), aparecimento ocasional de núcleos celulares atípicos, diminuição e distribuição heterogênea dos melanócitos, diminuição das células de Langerhans, a espessura da epiderme, o tamanho e a forma das células torna-se variável. Na derme ocorre atrofia, com perda de volume dérmico, alteração da estrutura de tecido conjuntivo, encurtamento dos *loops* capilares, aparecimento de terminações nervosas anormais, diminuição do número de fibroblastos, mastócitos e vasos sanguíneos. A nível dos apêndices cutâneos ocorre queda de cabelo, aparecimento de cabelos despigmentados, formação anormal das unhas, diminuição do número de glândulas, etc. (2, 3).

As rugas representam a consequência mais evidente do envelhecimento cutâneo. O aparecimento das primeiras rugas está ligado a uma variedade de eventos que resultam tanto do envelhecimento intrínseco como extrínseco, como por exemplo o achatamento da JDE devido à diminuição de lamininas e perda de colagénio, glicosaminoglicanos (GAGs) e gordura subcutânea; por outro lado a força gravitacional persistente e os movimentos musculares/articulares também desempenham um papel muito importante (5). Na face, as linhas de expressão ocorrem como resultado de uma contração repetida exercida pelos músculos faciais que acabam por levar à formação de sulcos profundos na testa e entre as sobrancelhas, na área periorbital e na prega nasolabial (3).

A possibilidade de retardar ou atenuar os sinais do envelhecimento cutâneo, os quais se manifestam na aparência, estrutura e função da pele e como tal na qualidade de vida, tem levado a uma grande pesquisa tanto na dermatologia como na cosmética.

1.2 Péptidos como ingredientes ativos usados em produtos cosméticos

Nos últimos anos, a indústria cosmética tem produzido inúmeros produtos e compostos químicos numa tentativa de “oferecer” aos consumidores produtos capazes de eficazmente retardar ou atenuar os processos de envelhecimento da pele.

Existem várias categorias de ingredientes ativos usados nesta área, como por exemplo as vitaminas e antioxidantes (vitamina A - retinoides, vitamina C), as hormonas (fito-estrogénios), ácidos alfa-hidróxidos (ácido glicólico e ácido láctico), ácidos beta-hidróxidos (ácido salicílico), péptidos (6), sendo esta última uma categoria relativamente recente e bastante popular no tratamento do envelhecimento cutâneo (7).

Os péptidos e proteínas usados em produtos cosméticos são divididos em 4 grupos distintos: péptidos de sinalização (“*signal peptides*”), péptidos inibidores de enzimas (“*enzyme-inhibitor peptides*”), péptidos inibidores de neurotransmissores (“*neurotransmitter-inhibitor peptides*”) e péptidos transportadores (“*carrier peptides*”) (8).

Os péptidos de sinalização têm a capacidade de aumentar a renovação dérmica através da estimulação direta dos fibroblastos dérmicos, inibindo a collagenase e aumentando a produção de substâncias fundamentais, apresentando deste modo um potencial efeito na melhoria da aparência das rugas finas e profundas (7). São exemplos deste grupo os seguintes péptidos:

- Tripéptido-1 (glicil-L-histidil-L-lisina ou GHK), o qual é primeiramente conhecido como sendo um péptido transportador (ver adiante). Contudo, apresenta também características de péptido de sinalização na medida em que demonstrou regular a síntese de colagénio na pele normal, sem patologias, por estimulação dos fibroblastos (7, 8).
- Palmitoil-tripéptido-3/5 (lisil-valina-lisina), o qual promove a formação de colagénio via fator de crescimento transformante β (na designação anglo-saxónica *Transforming Growth Factor Beta* – TGF- β), uma vez que mimetiza a sequência tripeptídica da trombospondina I, um ativador do TGF- β (7-9). Sabe-se que o TGF-beta-1 é um potente estimulador da secreção de colagénio pelos fibroblastos (10).
- Palmitoil-pentapéptido-4 (lisina-treonina-treonina-lisina-serina ou Pal-KTTKS), o qual é o péptido de sinalização mais popular e com mais estudos publicados. É um péptido sintético cuja sequência é encontrada no procolagénio tipo I. É capaz

de estimular a produção de colagénio I, II e VI e também de fibronectina, sendo usado topicamente como antirrugas e anti-envelhecimento (7, 8).

- Os péptidos inibidores de enzimas têm a capacidade de forma direta ou indireta de inibirem enzimas existentes na pele (8). São exemplos deste grupo os seguintes péptidos:
- Proteína de soja, que inibe a formação de protéases. É frequentemente usada como agente anti-envelhecimento e como hidratante, na medida em que estimula a síntese de glicosaminoglicanos (GAGs) (8).
- Aminoácidos/ péptidos do arroz, os quais inibem a atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs) e induzem a expressão do gene da sintetase do ácido hialurónico 2 nos queratinócitos, podendo ser encontrados em produtos anti-envelhecimento, *film-forming* e condicionadores de cabelo (8).

Os péptidos inibidores de neurotransmissores diminuem a contração muscular através de interações na junção neuromuscular. Estes péptidos inibem a libertação de acetilcolina na junção neuromuscular, tendo portanto, um efeito semelhante aos curares. Os ingredientes ativos pertencentes a esta categoria foram desenvolvidos com o intuito de mimetizar a toxina botulínica tipo A e como tal diminuírem a contração muscular facial, reduzindo deste modo a aparência das rugas e linhas finas (7, 8). São exemplos deste grupo os seguintes péptidos:

- Acetil-hexapéptido-3 (AC-gly glu-met-gln-arg-arg-NH₂), é um péptido sintético que inibe a formação do complexo SNARE (na designação anglo-saxónica *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors complex*) e portanto, a libertação de catecolaminas. Se comparado, este pequeno péptido apresenta melhor perfil toxicológico (toxicidade aguda: 2000 mg/Kg) do que a toxina botulínica tipo A (toxicidade aguda: 20 ng/Kg) (7, 8).
- Pentapéptido-3, péptido sintético antagonista competitivo dos recetores pós-sinápticos da acetilcolina, bloqueando a libertação de sódio o que impede uma contração tão frequente do músculo (7, 8).
- Pentapéptido-18, péptido que mimetiza as encefalinas naturais e como tal inibe a atividade neuronal e a libertação de catecolaminas, diminuindo assim a contração muscular (7, 8).
- Tripéptido-3, péptido que mimetiza a *Walgerin-1*, uma neurotoxina encontrada no veneno da Víbora do Templo (*Tropidolaemus wagleri*), a qual causa um antagonismo reversível dos recetores nicotínicos musculares da acetilcolina na membrana pós-sináptica, fazendo com que o músculo permaneça relaxado (7, 8).

Os péptidos transportadores auxiliam a entrega de cofatores à derme, necessários para a cicatrização de feridas e em vários outros processos ligados à manutenção da integridade da derme (7, 8). Dentro deste grupo o péptido mais comum é o tripéptido-1 (glicil-L-histidil-L-lisina ou GHK), já falado anteriormente (ver péptidos de sinalização). Este péptido facilmente complexa com o cobre e facilita o “*uptake*” deste metal pelas células. O cobre é um metal que intervém favoravelmente na cicatrização de feridas, em processos enzimáticos e na angiogénese. Existem vários mecanismos pelos quais o cobre apresenta efeitos benéficos na pele, por exemplo, são dependentes do cobre várias enzimas fundamentais à integridade e manutenção da pele, como a lisil oxidase (importante enzima na produção de colagénio e elastina), a tirosinase (responsável pela produção de melanina), a citocromo-c oxidase (enzima essencial à respiração celular) e a superóxido dismutase (enzima com função antioxidante). Para além de aumentar a disponibilidade de cobre, a sequência deste péptido é também encontrada nas proteínas da matriz extracelular como a cadeia alfa do colagénio e pensa-se que é libertada em situações de lesão e inflamação da pele. Como ingrediente ativo, este péptido terá efeitos na firmeza e textura da pele, nas linhas finas e na hiperpigmentação (7).

A utilização dos péptidos e proteínas no sentido de retardar ou atenuar os processos de envelhecimento da pele tem sido uma consequência da intensa pesquisa realizada sobre a cicatrização de feridas (11, 12).

O ingrediente ativo antirrugas a utilizar neste trabalho será um péptido de sinalização, o lipopéptido dioxigenado Palmitoil – Lisil – Dioximetionol – Lisina (ou Palmitoil-KMO₂K) (13).

1.2.1 Palmitoil-KMO₂K

O Palmitoil-KMO₂K é um péptido derivado do tripéptido KMK (Lisina – Metionina – Lisina) que é uma sequência encontrada naturalmente no colagénio VI e lamininas e, também na proteína protetora do ADN - HSP70. De acordo com a Sederma (empresa francesa que detém a patente deste lipopéptido), estudos preliminares demonstraram que esta sequência apresenta uma grande similitude estrutural e funcional com as matriquinas (13) (termo proposto por Maquart para designar péptidos com origem na matriz extracelular que resultam da quebra das proteínas dérmicas e que são capazes de regular a atividade celular (14)).

Testes *in vitro* demonstraram que o Palmitoil-KMO₂K é capaz de estimular a síntese de colagénio tipo I na derme a qual é acompanhada por um aumento concomitante da proteína charperónica HSP70. Para além deste, é também estimulada a síntese de outras

moléculas da derme (particularmente o colagénio tipo III, colagénio tipo IV, fibronectina e ácido hialurónico) e epiderme (particularmente as lamininas e fibronectina) (13, 15).

Um ensaio clínico realizado pela Sederma em 25 mulheres que aplicaram um creme com Matrixyl® Synthe'6™ (*Palmitoyl-KMO₂K*) a 2%, duas vezes por dia, durante dois meses, demonstrou que as rugas da testa e do contorno dos olhos das voluntárias foram suavizadas, com um efeito semelhante ao de um *lifting* (13).

1.3 Avaliação, quantificação e observação da pele

A biometria cutânea tem sido muito utilizada para verificar/registar as características da pele ou alterações que ocorrem como consequência da aplicação de produtos tópicos sejam eles de natureza dermofarmacêutica ou cosmética. As técnicas de biometria “clássicas”, permitem abordar de forma fiável e não-invasiva numerosas fatores que caracterizam e determinam a funcionalidade epidérmica e deste modo, quantificar e caracterizar alguns dos seus mais importantes indicadores (16, 17).

Hoje em dia os cientistas têm à sua disposição vários instrumentos e métodos para avaliar e quantificar de forma objetiva muitas propriedades da pele (18), como sendo, a hidratação cutânea, a atividade seboreica, o pH da superfície cutânea, a perda transepidérmica de água, as propriedades mecânicas da pele (elasticidade e plasticidade), o relevo cutâneo, a cor, a circulação cutânea, entre outras (16). Para além de uma caracterização objetiva, atualmente, é também possível, observá-la diretamente, *in vivo* e em tempo real através da microscopia.

1.3.1 Avaliação das propriedades mecânicas da pele

A pele é um órgão complexo que, como muitos outros sistemas biológicos, apresenta propriedades viscosas, típicas dos líquidos e, propriedades elásticas, típicas dos sólidos; razão pela qual as propriedades mecânicas da pele são muitas vezes chamadas de viscoelásticas. A própria função global de invólucro cutâneo constitui uma função direta das suas propriedades mecânicas, as quais, por sua vez, são determinadas pela hipoderme, pela derme e pela epiderme (19, 20).

Com o objetivo de avaliar as propriedades mecânicas da pele têm sido desenvolvidos vários métodos (17, 19), dos quais cito:

- Testes de tensão: em que a pele sofre uma extensão provocada pela aplicação de uma força paralela à superfície cutânea.
- Testes de torção: em que a pele sofre uma rotação provocada pela aplicação de um anel (“torque”) paralelo à superfície cutânea.

- Testes de elevação: em que a pele sofre uma elevação provocada por uma força vertical à superfície cutânea.
- Testes de indentação: em que a pele sofre uma depressão, cuja amplitude é avaliada, provocada por uma força vertical à superfície cutânea.
- Testes de vibração: em que são transmitidas vibrações à superfície cutânea, cuja propagação é transformada em sinais elétricos e, de seguida, quantificada.
- Testes de sucção: em que pele é aspirada para o interior de uma sonda e depois libertada. Estes testes permitem obter curvas de deformação da pele, que podem ser sujeitas a uma interpretação matemática, originando diversas variáveis.

A medição da viscoelasticidade da pele pode revestir-se de grande interesse no estudo de alterações fisiológicas ou patológicas da pele ou mesmo na avaliação de eficácia de produtos dermocosméticos (19, 20).

Neste estudo as propriedades mecânicas da pele serão avaliadas usando o dispositivo Cutometer®, cujo princípio é baseado no método de sucção. Esta sucção é assegurada por uma sonda que apresenta uma pequena abertura onde é criada uma pressão de ar negativa (até 500 mbar), o que faz com que a pele seja sugada por essa abertura e após um tempo definido libertada. A profundidade de penetração da pele para dentro da abertura é determinada, sem contacto, por um sistema de medição ótico (19, 21).

A resistência da pele à pressão negativa (firmeza) e a sua capacidade de voltar à sua posição inicial após sucção (elasticidade) são representadas como curvas de profundidade de penetração (mm) versus tempo (s), em tempo real durante a medição (Figura 1). A medição com esta sonda permite obter informação acerca das propriedades mecânicas da superfície da pele e quantificá-las de forma objetiva, por exemplo, através dos seguintes parâmetros (21, 22):

U_f ($U_e + U_v$) - Deformação total (elástica e plástica)

U_e - Deformação elástica

U_v - Deformação plástica ou viscoelasticidade

U_r - Retorno elástico

U_a - Elongação recuperada após a contração

R (resíduo) - Deformação residual após a contração

U_a/U_f - Índice de recuperação (após contração)

U_r/U_e - Relação de deformação elástica

U_v/U_e - Índice de viscoelasticidade

U_r/U_f - Índice de recuperação elástica ou parâmetro de firmeza

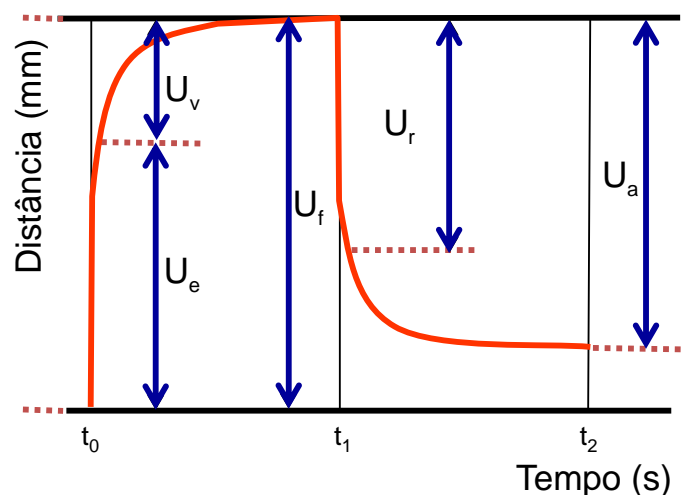


Figura 1 – Esquema gráfico de uma deformação cutânea obtida pelo método de sucção.
Adaptado de (19).

1.3.2 Avaliação do relevo da pele

A superfície cutânea não é plana apresentando um relevo característico dependendo do local anatômico, da idade e do gênero, o qual resulta da organização tridimensional da epiderme, derme e hipoderme. O relevo da pele inclui o microrrelevo (rede de pequenas linhas, algumas visíveis a olho nu) e as rugas (20, 23).

Diferentes métodos e equipamentos não-invasivos têm sido desenvolvidos com o objetivo de quantificar a presença de rugas ou outras deformações à superfície cutânea. Estes despertam especial interesse na indústria cosmética com a possibilidade de avaliação objetiva da eficácia de produtos antirrugas (19).

O relevo da pele pode ser avaliado através da análise de réplicas da pele, obtidas a partir de substâncias adesivas (resinas tipo epóxi/silicones) que são posteriormente avaliadas com recurso à profilometria mecânica, a dispositivos óticos ou por análise de imagem (19, 23); ou então avaliado diretamente na pele de indivíduos, *in vivo*, sem necessidade de réplicas.

Tanto a análise de réplicas como a análise *in vivo* apresentam vantagens e limitações. A título de exemplo, a medição *in vivo* evita as alterações induzidas pela hidratação normal da pele nos materiais que compõe as réplicas bem como as alterações morfológicas da pele que daí advêm. Por outro lado, a medição *in vivo*, é levemente afetada pelos movimentos involuntários dos organismos vivos (20).

Neste estudo será utilizado o método de medição *in vivo* usando o equipamento PRIMOS™ (“Phase Shift Rapid Imaging Of Skin”), que se baseia num sistema de projeção *fringe*. Um padrão de linhas paralelas (Figura 2), criado por um micro-espelho é projetado na pele por um sistema de projeção digital controlado por computador, e a

distorção da perspectiva desse padrão de linhas é avaliada por um sensor CCD de uma câmara digital, que está colocado num ângulo de triangulação definido, originando posteriormente uma imagem tridimensional. A medição é feita sem que haja qualquer contacto com a pele (24) (Figura 3).

O *software* do equipamento permite posteriormente avaliar parâmetros da pele tais como, a rugosidade (Tabela 1), o volume das rugas ou as suas dimensões geométricas. Permite ainda comparar a mesma área de pele com uma ferramenta do *software* que alinha dois conjuntos de dados obtidos, por exemplo em tempos diferentes, antes e após a aplicação de um produto cosmético.



Figura 2 – Ilustração da distorção de um padrão de linhas projetado num rosto humano.
Imagem retirada de (25).

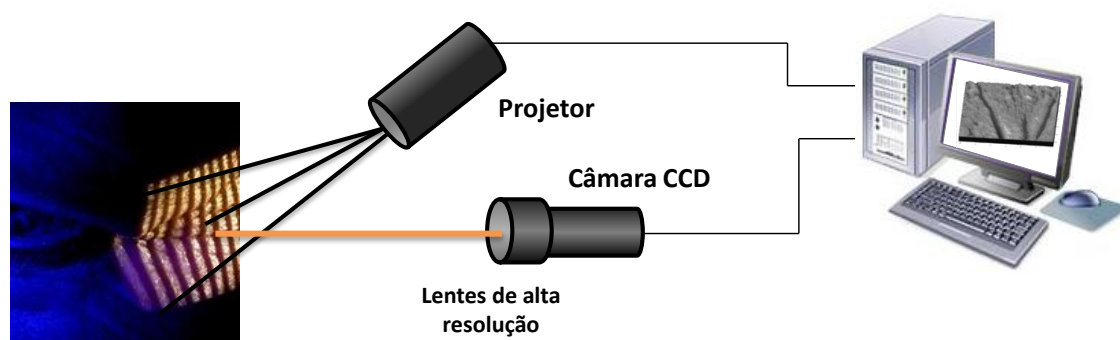


Figura 3 – Esquema simplificado representativo do funcionamento do equipamento PRIMOS™ para medição do relevo cutâneo *in vivo*.

Tabela 1 – Exemplos de alguns parâmetros de rugosidade obtidos com equipamento PRIMOS™.

| | |
|-----------------------------------|---|
| Rugosidade aritmética (Ra) | Média de todas as alturas e profundidades em relação ao plano referência (26). |
| Rugosidade máxima (Rmax) | Diferença entre o valor mais elevado e o mais profundo de uma única seção de medições (26). |
| Rugosidade total (Rt) | Média das amplitudes dos 5 picos mais altos e das 5 depressões mais profundas (26). |

1.3.3 Observação da pele

Apesar de a pele ser um órgão acessível à visão e ao tato, apenas o é para a sua camada mais externa, o estrato córneo. Atualmente, graças à biometria é possível de forma não-invasiva e repetida visualizar a pele em profundidade e obter informações mensuráveis, baseadas em técnicas objetivas (20), sem recorrer às incômodas biópsias da histologia convencional.

Para que seja possível observar microscopicamente um tecido animal, de uma forma convencional, é necessário que se proceda ao corte, fixação e coloração do tecido. Atualmente é possível “seccionar oticamente” tecidos sólidos de forma não-invasiva através de várias tecnologias desenvolvidas com o intuito de visualizar as células de uma forma dinâmica (27). São exemplos destas técnicas a microscopia confocal, a tomografia de coerência ótica, a microscopia laser multifotônica e os ultrassons de alta frequência. Para a indústria cosmética estas tecnologias são extremamente úteis uma vez que, embora a análise histológica seja prática constante no diagnóstico de doenças dermatológicas, por razões éticas, os testes de produtos cosméticos devem ser realizados com métodos não-invasivos (2).

Neste estudo a observação da pele será realizada com recurso ao microscópio confocal. O princípio da microscopia confocal baseia-se na iluminação da amostra ponto por ponto e “recolha” seletiva da luz através da utilização de um orifício de abertura muito pequena (“pin-hole”), que permite rejeitar a maioria da luz não desejada, designada por *scattering* (28-30) (Figura 4).

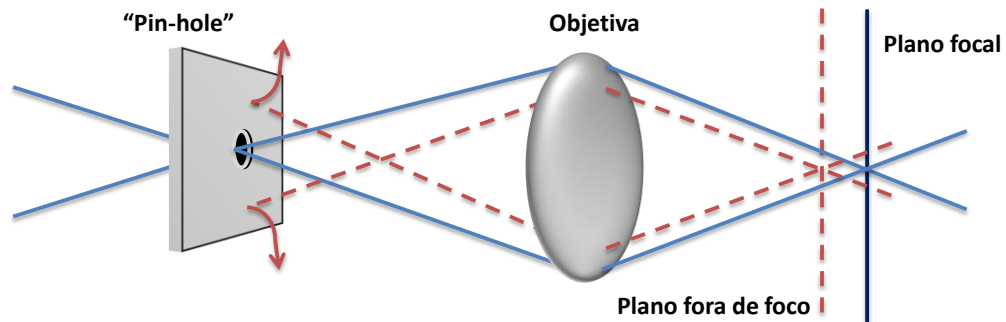


Figura 4 – Esquema representativo do princípio da microscopia confocal.

De uma forma muito simplificada o funcionamento do microscópio confocal consiste na utilização de uma fonte de luz laser que emite um feixe de luz que passará através de uma abertura muito pequena. Um ponto de luz é então focado no plano focal desejado na amostra pela objetiva. A existência desta abertura muito pequena permite direcionar a luz para o plano focal, evitando que toda a amostra seja iluminada. Apesar de, posteriormente, haver uma “recolha” seletiva da luz dos planos em foco, se toda a amostra fosse iluminada a luz recolhida iria certamente incluir luz refletida por outros pontos. Deste modo, a luz apenas será refletida pelo plano focal e pelos planos fora de foco que se encontram acima e abaixo do plano focal. No entanto, devido à existência de um segundo orifício muito pequeno, que se encontra antes do detetor e num plano focal opticamente conjugado com o plano do ponto luz (plano confocal), apenas chega até ao detetor a luz do único plano em foco (27, 29-31). Como a objetiva é atravessada pela luz que vem da fonte de luz e pela luz refletida pela amostra, portanto por diferentes comprimentos de onda, há necessidade de se incluir um filtro que permita separar os diferentes comprimentos de onda sem que estes sejam perdidos (Figura 5). Este filtro é um espelho dicromático que reflete ou permite a passagem da luz a comprimentos de onda específicos (32).

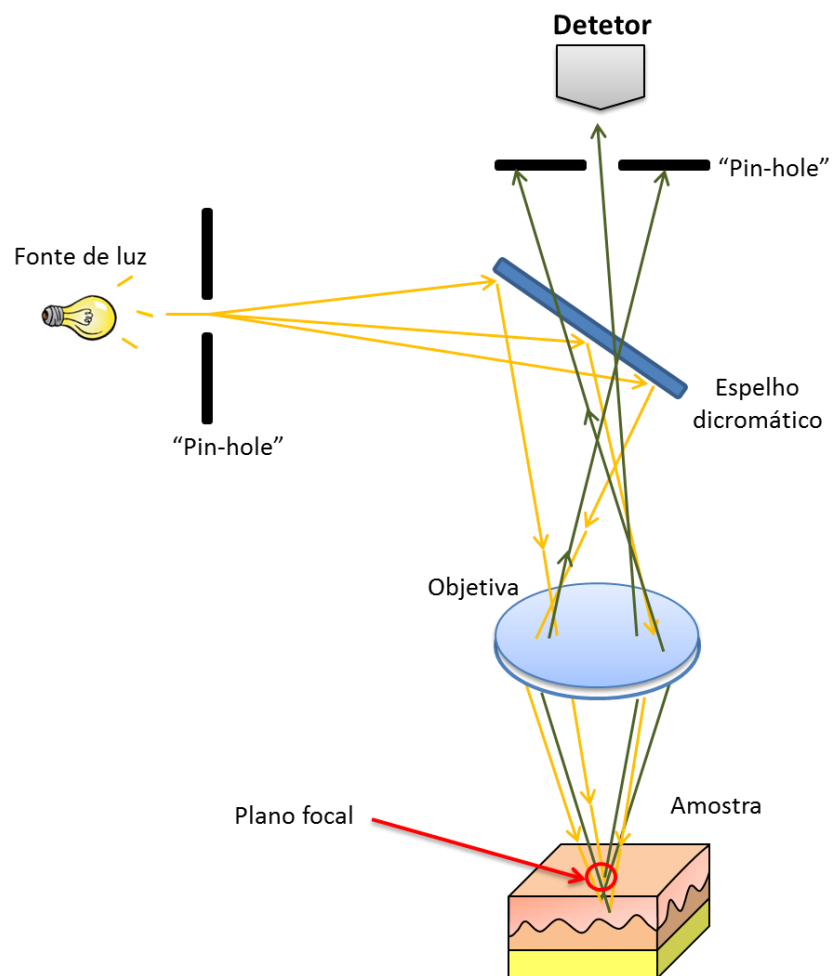


Figura 5 – Esquema simplificado representativo do funcionamento de um microscópio confocal.

Como é medido um ponto de cada vez, é realizado um varrimento, através do qual o ponto medido é deslocado num plano paralelo à superfície da amostra. Amostragens sequenciais levam a medições que, processadas informaticamente, se tornam pixéis em imagens. O varrimento bidimensional permite obter imagens de um plano fino ou de uma secção ótica fina dentro do tecido, que difere dos convencionais cortes ortogonais da histopatologia na medida em que estes são orientados perpendicularmente à superfície da pele e as secções óticas estão orientadas paralelamente (27) (Figura 6).

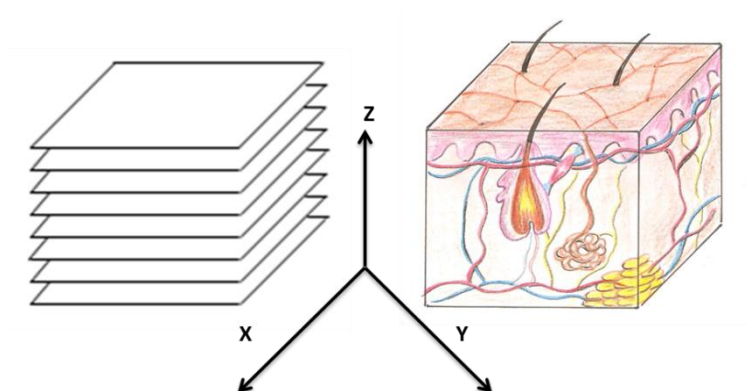


Figura 6 – Exemplificação do seccionamento ótico realizado com o microscópio confocal.

Para análise da pele *in vivo* é usada a microscopia confocal de refletância (na designação anglo-saxónica *Reflectance Confocal Microscopy* – RCM), assim chamada por originar uma imagem ótica de refletância que se baseia nas variações naturais dos índices de refração das microestruturas do tecido para obter contraste (27). As estruturas do tecido com um elevado índice refrativo atuam como um “corante endógeno” e aparecem na RCM de cor branca. Tecidos com um índice refrativo baixo aparecem a escuro (33). Na pele humana, a melanina apresenta forte contraste citoplasmático, sendo a principal fonte de contraste endógeno (34). Outras fontes incluem a queratina, as mitocôndrias e outros organelos citoplasmáticos, a cromatina no núcleo, e o colagénio na derme (27).

A RCM permite visualizar secções de pele saudável, sem qualquer lesão ou fissura, a uma profundidade de cerca de 250 a 300 μm , com uma boa visualização da epiderme, derme papilar e derme reticular superior (27).

1.4 Objetivo do trabalho

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia antirrugas do péptido Palmitoil-KMO₂K utilizando diversas técnicas biométricas não invasivas e verificar se existe alguma correlação entre os parâmetros obtidos com as diferentes técnicas utilizadas.

2 Parte Experimental

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Materiais

Durante o desenvolvimento de formulação do creme base foram utilizadas as matérias-primas descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Matérias-primas usadas durante a fase de desenvolvimento de formulação.

| MATÉRIA-PRIMA (NOME INCI) | FABRICANTE/FORNECEDOR | LOTE |
|--|--|-------------|
| Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (Caprylic/capric triglyceride) | Guinama | 0026482 |
| Cera de abelhas (Cera alba) | Acofarma® | 130761-P-1 |
| Álcool estearílico (Stearyl alcohol) | Acofarma® | 131419-P-1 |
| Álcool cetílico | Guinama | 0012916 |
| Miristato de isopropilo (Isopropyl myristate) | Acofarma® | 130239-P-1 |
| Tego® care 450 (Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate) | Evonik/DS - produtos químicos Lda | ES62187292 |
| Goma xantana (Xanthan gum) | Acofarma® | 130516-N-1 |
| Glicerina (Glycerin) | Acofarma® | 131219-P-1 |
| EDTA Dissódico (Disodium EDTA) | Acofarma® | 130204-J-1 |
| Metilparabeno (Methylparaben) | Acofarma® | 121409-J-3 |
| Propilparabeno (Propylparaben) | Acofarma® | 130234-J-1 |
| VanElegance® 4042 (Parfum) | Vanessence/ Comercial Química Jover | 2013210105 |
| Silk and Velvet | <i>Bell Flavors & Fragrances</i> | 0800283 |
| Fleur | Ravetllat/Quimiporto | F38341L |
| Nival | Iberchem | 352156 |
| Amanda | Iberchem | 3511526 |

O ingrediente ativo cosmético antirrugas utilizado neste estudo foi o lipopéptido dioxigenado Palmitoyl – Lysyl – Dioxymethionyl – Lysine (ou Palmitoyl-KMO₂K) comercializado pela empresa Sederma com o nome comercial de Matrixyl® Synthe'6™ (Tabela 3), patente WO 2010/082175 (13). A Sederma por intermédio do distribuidor DS - produtos químicos Lda cedeu algumas amostras (lote 0000736626) para realização deste estudo.

Tabela 3 – Composição do ingrediente cosmético Matrixyl® Synthe'6™.

| Composição (13) | Nomenclatura INCI |
|------------------------------------|----------------------------|
| Água | Aqua |
| Glicerina | Glycerin |
| Hidroxipropil-ciclodextrina | Hydroxypropyl Cyclodextrin |
| Palmitoyl-KMO₂K | Palmitoyl Tripeptide-38 |

Para realização do ensaio a substância teste foi incorporada numa base, um creme hidrófilo (Tabela 4), desenvolvido para este estudo.

Tabela 4 – Composição qualitativa e quantitativa do creme base.

| MATÉRIA-PRIMA (NOME INCI) | % | FUNÇÃO | FORNECEDOR | LOTE |
|--|----------|---|----------------------------|-------------|
| Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (Caprylic/capric triglyceride) | 10,00 | Emoliente | Guinama | 0026482 |
| Cera de abelhas (Cera alba) | 5,00 | Viscosificante/ Estabilizador da emulsão/Emoliente | Acofarma® | 130761-P-1 |
| Álcool estearílico (Stearyl alcohol) | 6,00 | Viscosificante/ Estabilizador da emulsão/Agente emulsivo O/A/ Emoliente | Acofarma® | 131419-P-1 |
| Miristato de isopropilo (Isopropyl myristate) | 3,00 | Emoliente | Acofarma® | 130239-P-1 |
| Tego® care 450 (Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate) | 3,00 | Agente emulsivo O/A | DS - produtos químicos Lda | ES62187292 |
| Goma xantana (Xanthan gum) | 0,40 | Viscosificante | Acofarma® | 130516-N-1 |
| Glicerina (Glycerin) | 3,00 | Humectante | Acofarma® | 131219-P-1 |

| | | | | |
|---|-----------------|-----------------|----------------------------|------------|
| EDTA Dissódico (Disodium EDTA) | 0,13 | Agente quelante | Acofarma® | 130204-J-1 |
| Metilparabeno (Methylparaben) | 0,20 | Conservante | Acofarma® | 121409-J-3 |
| Propilparabeno (Propylparaben) | 0,10 | Conservante | Acofarma® | 130234-J-1 |
| VanElegance® 4042 (Parfum) | 0,10 | Fragrância | Comercial Química Jover | 2013210105 |
| Água (Aqua) | q.b.p 100,00 | Fase externa | - | - |

2.1.2 Métodos

2.1.2.1 Estudo de estabilidade

Para estudar a estabilidade da formulação em que foi incorporada a substância teste foi preparado um lote de 600 g do creme base de acordo com o procedimento descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Fórmula e modo de preparação do creme base para estudos de estabilidade.

| Matéria-prima | Quantidade para 100g |
|---|----------------------|
| <i>Fase A (hidrófila)</i> | |
| Água | q.b. |
| Glicerina | 3,00 |
| Goma xantana | 0,40 |
| Metilparabeno | 0,20 |
| Propilparabeno | 0,10 |
| EDTA dissódico | 0,13 |
| <i>Fase B (hidrófoba)</i> | |
| Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico | 10,00 |
| Cera de abelhas | 5,00 |
| Álcool estearílico | 6,00 |
| Miristato de isopropilo | 3,00 |
| TegoCare® 450 (Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate) | 3,00 |
| <i>Fase C</i> | |
| Fragrância VanElegance | 0,10 |

| Procedimento |
|---|
| 1. Pesar a glicerina e a água para um recipiente de capacidade apropriada e aquecer a uma temperatura entre 60-70°C. |
| 2. Pesar a goma xantana e dispersá-la na água com a glicerina previamente aquecidas. |
| 3. Pesar os triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, o álcool estearílico, a cera de abelhas, o miristato de isopropilo e o Tego® Care 450 para uma cápsula de porcelana e fundir à temperatura de 60-70°C. |
| 4. Após completa dispersão da goma xantana adicionar os parabenos e o EDTA, um a um, até dissolução completa na fase aquosa. |
| 5. Quando ambas as fases estiverem à mesma temperatura adicionar a fase hidrófoba à fase aquosa, com agitação intensa. |
| 6. Desligar o aquecimento e manter agitação lenta até arrefecimento completo. |
| 7. Adicionar a fragrância e homogeneizar. |
| 8. Determinar o pH e se necessário ajustar para 5,0 - 6,0. |

Após preparação o creme foi armazenado em diferentes condições de temperatura: à temperatura ambiente e a 40°C.

As especificações estabelecidas para o creme base estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Especificações do creme base.

| ESPECIFICAÇÕES | | |
|-------------------------------|---|-----------|
| Características Organoléticas | | pH |
| Aspetto | Homogêneo | 5,0 – 6,0 |
| Cor | Branca | |
| Odor | Característico à fragrância VanElegance | |

2.1.2.1.1 Centrifugação

Após preparação uma amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante uma hora, em dois ciclos de 30 minutos, utilizando a centrífuga Centrifuge 5804 (Eppendorf, Germany).

2.1.2.1.2 Análise das características organoléticas

A análise organolética do creme base realizou-se após a sua preparação, ao fim de um mês e ao fim de três meses, em ambas as temperaturas de armazenamento ensaiadas. Os parâmetros avaliados foram o aspecto, a cor e o odor.

2.1.2.1.3 Avaliação do pH

O pH do creme base (solução a 10% em água neutra) foi avaliado utilizando o potenciômetro pHenomenal 662-1152 (VWR, Germany) após a sua preparação, ao fim de um mês e ao fim de três meses, em ambas as temperaturas de armazenamento ensaiadas. A análise foi realizada em triplicado para cada amostra.

2.1.2.1.4 Determinação da viscosidade

O estudo do comportamento reológico do creme base foi avaliado após a sua preparação, ao fim de um mês e ao fim de três meses, em ambas as temperaturas de armazenamento ensaiadas. Determinou-se a viscosidade de 1 a 500 s⁻¹ e de 500 a 1 s⁻¹, à temperatura constante de 25,5°C, utilizando o viscosímetro *Thermo Haake VT550* (Thermo Electron, UK). A análise foi realizada em triplicado para cada amostra.

2.1.2.2 Preparação do produto teste

O produto teste foi preparado de acordo com o método geral de preparação de emulsões. O procedimento realizado encontra-se detalhado na Tabela 7.

Tabela 7 – Fórmula e modo de preparação do produto teste.

| Matéria-prima | Quantidade para 100g |
|---|----------------------|
| <i>Fase A (hidrófila)</i> | |
| Água | q.b. |
| Glicerina | 3,00 |
| Goma xantana | 0,40 |
| Metilparabeno | 0,20 |
| Propilparabeno | 0,10 |
| EDTA dissódico | 0,13 |
| <i>Fase B (hidrófoba)</i> | |
| Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico | 10,00 |
| Cera de abelhas | 5,00 |
| Álcool estearílico | 6,00 |
| Miristato de isopropilo | 3,00 |
| TegoCare® 450 (Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate) | 3,00 |
| <i>Fase C</i> | |
| Matrixyl® Synthe'6™ | 2,00 |
| <i>Fase D</i> | |

| | |
|---|------|
| Fragrância VanElegance | 0,10 |
| Procedimento | |
| 1. Pesar a glicerina e a água para um recipiente de capacidade apropriada e aquecer a uma temperatura entre 60-70°C. | |
| 2. Pesar a goma xantana e dispersá-la na água com a glicerina previamente aquecidas. | |
| 3. Pesar os triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, o álcool estearílico, a cera de abelhas, o miristato de isopropilo e o Tego® Care 450 para uma cápsula de porcelana e fundir à temperatura de 60-70°C. | |
| 4. Após completa dispersão da goma xantana adicionar os parabenos e o EDTA, um a um, até dissolução completa na fase aquosa. | |
| 5. Quando ambas as fases estiverem à mesma temperatura adicionar a fase hidrófoba à fase aquosa, com agitação intensa. | |
| 6. Desligar o aquecimento e manter agitação lenta. | |
| 7. Adicionar o Matrixyl® Synthe'6™ (temperatura entre 80°C-25°C) e homogeneizar até aspeto homogéneo. | |
| 8. Após arrefecimento completo adicionar a fragrância e homogeneizar até aspeto homogéneo. | |
| 9. Determinar o pH e se necessário ajustar para 5,0 - 6,0. | |
| 10. Verificar se o creme cumpre as especificações organoléticas e de pH previamente estabelecidas. | |
| 11. Acondicionar em recipiente apropriado. | |

Foram preparados dois lotes do produto teste, um deles antes do início do estudo e outro após um mês do início do estudo.

2.1.2.3 Protocolo de estudo

Para realização do presente estudo foi requerida a autorização da comissão de ética do Centro Hospitalar de Gaia/Espinho a qual, após apreciação de uma descrição detalhada dos materiais e métodos e protocolo de estudo, emitiu um parecer favorável à realização deste estudo.

a) Nº de voluntários:

- 30 voluntários.

Não foi atribuída qualquer compensação monetária pela participação no estudo.

b) Critérios de inclusão:

- Bom estado geral de saúde;
- Sexo feminino;
- Idade igual ou superior a 40 anos;
- Com rugas visíveis na zona periorbital;

- Ausência de dermatoses;
- Ausência de história clínica de reações irritantes ou alérgicas a produtos de aplicação cutânea;
- Ausência de cicatrizes ou lesões cutâneas nos locais teste;
- Ausência de utilização de produtos cosméticos antirrugas 15 dias antes do início do ensaio.

c) Critérios de exclusão:

- Grávidas ou mulheres a amamentar;
- Mulheres que não estejam dispostas a abdicar do uso de produtos cosméticos antirrugas durante o período do ensaio.

d) Zona anatômica teste:

Rosto: região periorbital

O lado da região periorbital a analisar foi sempre o lado direito, em todas as voluntárias.

e) Equipamento:

- Cutometer® MPA 580 (Courage+Khazaka, Köln, Germany)
- Visioface® 1000 D (Courage+Khazaka, Köln, Germany)
- PRIMOS™ *premium* (GfMesstechnik, Berlin, Germany)
- VivaScope® 1500 (MAVIG GmbH, Munich, Lucid-Tech Inc., Henrietta, NY, U.S.A.)

f) Produto testado:

- Creme contendo 2% Matrixyl® Synthe'6™

g) Metodologia:

Dia 1: Conversa com a voluntária para verificar os critérios de inclusão e explicar os objetivos do estudo (preenchimento do questionário de recrutamento – Anexo I). Após explicação oral foram fornecidas às voluntárias as instruções do estudo em papel (Anexo II). Todas as voluntárias que decidiram participar no estudo preencheram um consentimento informado (Anexo III).

Nas voluntárias incluídas foram realizadas as medições iniciais. Estas incluíram:

- Macrofotografias de todo o rosto, com o equipamento Visioface® 1000 D.

- Avaliação das propriedades mecânicas da pele, elasticidade e plasticidade com o dispositivo Cutometer®.
- Avaliação do relevo da pele com o equipamento PRIMOS™.
- Observação das diferentes camadas de pele a um nível celular com o microscópio confocal VivaScope® 1500.

Após as medições foi entregue a cada voluntária um creme contendo 2% Matrixyl® Synthe'6™, para aplicarem duas vezes por dia em todo o rosto.

Dia 30: Avaliação correspondente ao tempo de 30 dias decorrido do início de aplicação do creme com o ingrediente ativo cosmético em estudo. Neste dia foram realizadas as seguintes medições:

- Macrofotografias de todo o rosto, com o equipamento Visioface® 1000 D.
- Avaliação das propriedades mecânicas da pele, elasticidade e plasticidade com o dispositivo Cutometer®.
- Avaliação do relevo da pele com o equipamento PRIMOS™.
- Observação das diferentes camadas de pele a um nível celular com o microscópio confocal VivaScope® 1500.

Após as medições foi entregue a cada voluntária um novo creme contendo 2% Matrixyl® Synthe'6™, para aplicarem duas vezes por dia em todo o rosto até ao final do estudo.

Dia 60: Avaliação final correspondente ao tempo de 60 dias decorrido do início de aplicação do creme com o ingrediente ativo cosmético em estudo. Neste dia foram realizadas as seguintes medições:

- Macrofotografias de todo o rosto, com o equipamento Visioface® 1000 D.
- Avaliação das propriedades mecânicas da pele, elasticidade e plasticidade com o dispositivo Cutometer®.
- Avaliação do relevo da pele com o equipamento PRIMOS™.
- Observação das diferentes camadas de pele a um nível celular com o microscópio confocal VivaScope® 1500.

2.1.2.4 Avaliação do efeito sobre as propriedades mecânicas da pele

As propriedades viscoelásticas da pele foram avaliadas pelo método de sucção usando o equipamento Cutometer® MPA 580 (Courage+Khazaka, Köln, Germany).

Medições na região periorbital, ao longo da maçã do rosto, foram realizadas antes da utilização do produto teste, um mês e dois meses após aplicação do mesmo. As voluntárias foram deitadas numa marquesa, em posição dorsal, e a sonda foi encostada à pele no local pretendido para medição e mantida em posição vertical e imóvel durante a

medição. A pele foi sugada pela abertura da sonda (2 mm, diâmetro geralmente utilizado para a determinação das propriedades mecânicas da epiderme e derme reticular (20, 35)) durante 3 segundos com uma pressão de ar negativa de 400 mbar. Após os 3 segundos a pressão negativa foi desligada e a pele retornou à sua posição original completando um ciclo. Em cada medição foram realizados três ciclos que resultaram em três curvas de profundidade (mm) versus tempo (s) por medição. Foram realizadas três medições em locais adjacentes na região periorbital. Apenas foram realizadas medições de um dos lados do rosto, o lado direito e foram realizadas numa sala fechada, sem luz solar direta, com controlo da temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e da humidade relativa ambientais ($60 \pm 10\%$).

As curvas obtidas permitiram o cálculo dos seguintes parâmetros relativos as propriedades viscoelásticas da pele:

- **Uf** - Deformação total da pele (elástica e plástica)
- **Ur/Ue** - Relação de deformação elástica (Índice de elasticidade)
- **Ur/Uf** - Parâmetro de firmeza (Índice de recuperação elástica)

Para análise dos dados foi utilizado o *software CutometerQ* (CK electronic).

2.1.2.5 Avaliação do efeito sobre o relevo da pele

O relevo da pele foi avaliado utilizando o método de medição *in vivo* usando o equipamento PRIMOS™ *premium* (GfMesstechnik, Berlin, Germany), que se baseia num sistema de projeção *fringe*.

Três imagens foram adquiridas da região periorbital antes da utilização do produto teste, um mês e dois meses após aplicação do mesmo, tendo sido escolhida, para análise dos resultados, a imagem com melhor qualidade. Apenas foram realizadas medições de um dos lados do rosto, o lado direito (Figura 7). A aquisição de imagens realizou-se numa sala escura, sem luz natural.

Durante as medições realizadas antes da utilização do produto teste foram registados o ângulo de medição e as condições de iluminação para cada voluntária (Anexo IV). As imagens correspondentes ao tempo um mês e dois meses após aplicação do produto foram sobrepostas com as imagens adquiridas inicialmente sob as mesmas condições de medição (previamente registadas), a fim de se obter uma correspondência e análise de resultados mais precisa.

Para cada zona analisada foram obtidos os seguintes parâmetros:

- **Volume das cavidades** - volume calculado com base nos perfis de altura abaixo do plano de referência.
- **Profundidade da ruga** - profundidade média das rugas.

- **Rugosidade aritmética (Ra)** - Média de todas as alturas e profundidades em relação ao plano referência.

Para análise dos dados foi utilizado o *software* PRIMOS 5.8E (GFMesstechnik Berlin, Germany), que através de algoritmos matemáticos consegue reconstruir os dados obtidos pela distorção do padrão de linhas projetado na pele num perfil 3D altamente preciso da superfície da pele. Para determinação da rugosidade foi utilizado o modo “Star Roughness” que através de algoritmos específicos permite desenhar, no perfil adquirido da superfície da pele, um perfil de 20 linhas disposto em arranjo radial e assim calcular a rugosidade média desse perfil.

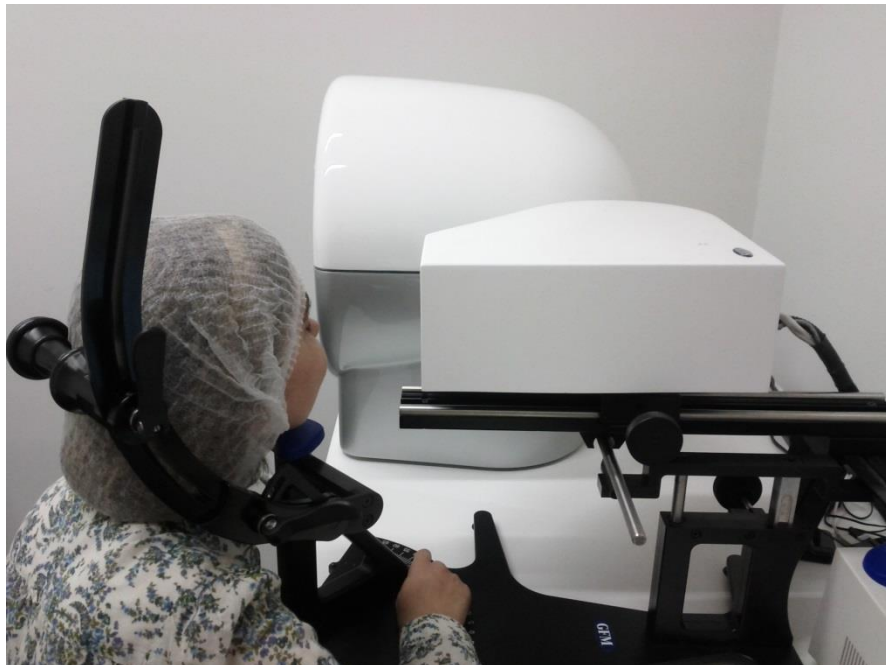


Figura 7 - Voluntária durante aquisição de imagens com o equipamento PRIMOS™.

2.1.2.6 Observação da pele e quantificação das fibras de colagénio

Fotografias de alta resolução do rosto (Figura 8) em posição frontal e lateral foram adquiridas com o equipamento Visioface® 1000 D (Courage+Khazaka, Köln, Germany) antes da utilização do produto teste, um mês e dois meses após aplicação do mesmo. Todas as fotografias foram adquiridas numa sala escura, sem luz natural.

Para aquisição das fotografias de alta resolução foi utilizado o *software* CSI (Complete Skin Investigation, CK electronic).



Figura 8 - Voluntária durante aquisição de macrofotografias com o equipamento Visioface® 1000 D.

A visualização da pele em profundidade e avaliação das fibras de colagénio foi realizada *in vivo* utilizando a microscopia confocal através do equipamento VivaScope® 1500, com a ajuda de um dermatologista experiente em microscopia confocal.

As voluntárias foram deitadas numa marquesa, em posição dorsal, de modo a que se encontrassem numa posição cómoda durante a aquisição das imagens. Em cada uma foi marcado o local onde seria realizada esta aquisição, com o objetivo de avaliar sensivelmente o mesmo local em todos os tempos. Para esta marcação foi utilizada uma régua que era colocada no rosto da voluntária desde o lóbulo da orelha (onde ficava o número 1) até ao canto externo do olho (Figura 9). O número da régua que correspondia ao canto externo do olho foi registado numa ficha de registo de medições e foi escolhido na primeira medição um número da régua que se encontrasse na zona temporal, o qual era marcado com um ponto na pele da voluntária com recurso a uma caneta de acetato e também registado na ficha de registo de medições dessa voluntária (Anexo V). Nas medições seguintes, ou seja, ao fim de um mês e dois meses, foi realizado o mesmo procedimento, marcando-se na pele da voluntária o ponto escolhido na primeira medição com base na ficha de registo das medições (Anexo V).

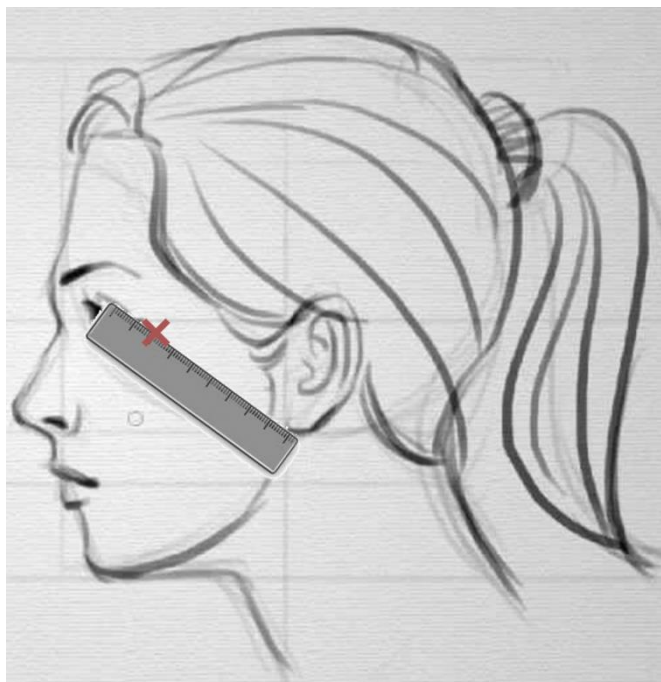


Figura 9 – Ilustração do modo de marcação do local a avaliar com microscópio confocal em cada voluntária.

Após marcação do local a avaliar e com o objetivo de fixar o microscópio à pele e evitar a interferência de movimentos involuntários por parte da voluntária durante a aquisição das imagens foi colado na pele, na posição “3 horas”, um anel de aço inoxidável, onde previamente se colocou uma janela adesiva com uma gota de óleo (Figura 10). De seguida para gerar as imagens confocais da pele foi aplicada uma pequena quantidade de gel de ultrassom sobre o anel fixando-se o microscópio a este último (Figura 11).



Figura 10 – Anel de aço inoxidável (seta verde) com janela adesiva (seta vermelha) para fixação do microscópio confocal à pele.



Figura 11 – Voluntária durante aquisição de imagens com o microscópio confocal VivaScope® 1500.

Para visualização da pele em profundidade foram captados três “VivaCubes” (Lucid) de 8x8 imagens, correspondentes a 4x4 mm de pele (Figura 12), cada um a uma profundidade diferente (30 μm , 55 μm e 85 μm), com objetivo de se visualizar a epiderme, a JDE e a derme. As profundidades referidas eram calculadas com base no “zero”, o qual era marcado após visualização do halo do anel de fixação do microscópio (Figura 13) e descida do laser em profundidade na pele 24,82 μm .

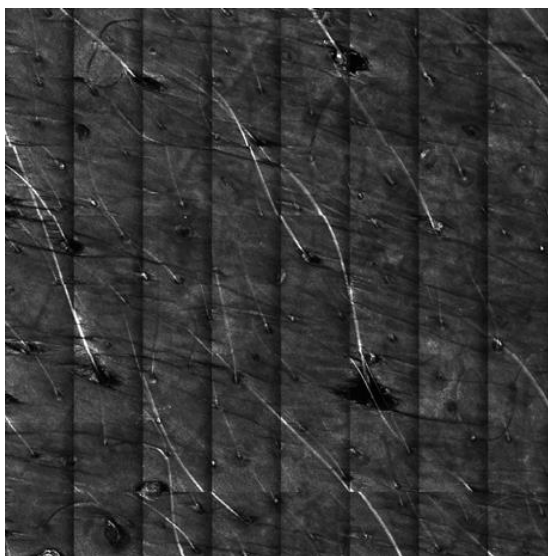


Figura 12 – Ilustração de um “VivaCub” adquirida a uma profundidade de 30 μm .

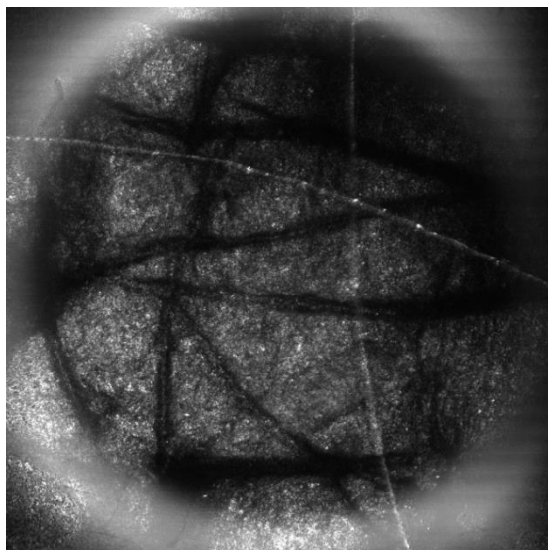


Figura 13 – Imagem confocal do estrato córneo onde é possível visualizar o halo do anel de aço inoxidável usado para fixar o microscópio confocal à pele.

Para avaliação das fibras de colagénio uma sequência de imagens “VivaStack” (Lucid) com 0,5x0,5 mm de resolução lateral foi adquirida de 2 em 2 μm desde a superfície da pele até a uma profundidade de 200 μm .

Os “VivaCubes” e “VivaStack” foram adquiridos como já referido na região periorbital, antes da utilização do produto teste, um mês e dois meses após aplicação do mesmo. Apenas foram recolhidas imagens de um dos lados do rosto, o lado direito.

Para análise dos dados foi utilizado o *software Confoscan 1.0.12* (OrionTechnoLab, France), que permitiu obter os seguintes parâmetros:

- **Perímetro médio dos objetos analisados** – média do perímetro de todos os objetos detetados na série de imagens selecionadas.
- **Área média dos objetos analisados** – média da área de todos os objetos detetados na série de imagens selecionadas.
- **Índice de fragmentação médio A** – relação entre o número de objetos analisados e a sua área.

Após seleção das imagens da sequência “VivaStack” correspondentes à derme, onde as fibras do tecido conjuntivo são visíveis, foi selecionada uma área de cada imagem denominada pelo *software* de “região de interesse”. Neste estudo foram selecionadas 3 imagens de cada tempo e foi definida como “região de interesse” toda a área das imagens, ou seja, 0,5x0,5 mm. O *software* por meio de um algoritmo e de um limiar de deteção reconhece as zonas mais brilhantes da imagem as quais denomina de “objetos”, permitindo deste modo a deteção das fibras de colagénio que se apresentam na derme como estruturas fibrilares brilhantes de forma alongada, sem componentes celulares e sem núcleo visível.

2.1.2.7 Análise estatística

Para cada um dos parâmetros analisados efetuou-se uma análise estatística descritiva dos resultados experimentais, através do cálculo da média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil, achatamento ou curtose, assimetria, da identificação de *outliers* e da sua representação gráfica.

Para classificar a distribuição de dados quanto à normalidade procedeu-se à realização do teste de Shapiro-Wilk para as diferenças, ao fim de um mês e ao fim de dois meses, usando como nível de significância $\alpha = 0,05$. Nos casos em que este teste foi significativo avaliaram-se as medidas de simetria e de achatamento das distribuições. Quando o resultado do quociente entre a simetria e o seu erro padrão e o resultado do quociente entre a curtose e o seu erro padrão está dentro do intervalo $]-1,96;1,96[$ a distribuição diz-se simétrica e mesocúrtica, considerando-se que o desvio da normalidade não é crítico. Nos casos em que a distribuição não era normal para as diferenças foram utilizados, para análise estatística, os resultados obtidos no início do estudo e nos tempos de avaliação de um mês e dois meses.

Para comparar os valores observados das variáveis que seguiam uma distribuição normal aplicaram-se os testes paramétricos *t-student* para uma amostra, no caso das diferenças e, *t-student* para amostras emparelhadas no caso em que se comparou os resultados obtidos no início do estudo e nos tempos de avaliação de um mês e dois meses. Nos casos em que a distribuição dos resultados não era normal, utilizou-se, em alternativa, um teste não paramétrico, nomeadamente o teste de Wilcoxon (para amostras emparelhadas).

Para correlacionar todos os parâmetros estudados, ou seja, avaliar a intensidade de uma associação linear existente entre as variáveis estudadas foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson para as diferentes variáveis ao início do estudo e para as diferenças ao fim de dois meses.

A análise estatística foi efetuada com o programa IBM SPSS Statistics 22 para o *software Windows* (IBM corp, New York, USA), estabelecendo-se diferentes níveis de significância (36) para aceitação dos resultados obtidos:

- Diferença quase significativa para nível de significância entre 10%, inclusive e, 5% ($0,1 \leq p < 0,05$);
- Diferença significativa para nível de significância entre 5%, inclusive e, 1% ($0,05 \leq p < 0,01$);
- Diferença muito significativa para nível de significância menor ou igual a 1% ($p \leq 0,01$).

2.2 Resultados

Das 30 voluntárias incluídas apenas 26 concluíram o estudo.

A média de idades das voluntárias incluídas foi de 53 anos. A voluntária com mais idade tinha 61 anos e a voluntária mais nova tinha 41 anos.

2.2.1 Desenvolvimento de formulação

Tabela 8 – Composição das diferentes fórmulas testadas durante a fase de desenvolvimento de formulação.

| MATÉRIA-PRIMA | FÓRMULA | | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
| FASE HIDRÓFOBA | | | | | | | | |
| Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico | 7,00 | 9,00 | 9,00 | 8,00 | 9,00 | 9,00 | 10,00 | 12,00 |
| Álcool estearílico | 5,00 | 8,00 | 9,00 | 10,00 | 11,00 | | 6,00 | 5,00 |
| Álcool cetílico | | | | | | 12,00 | | |
| Cera de abelhas | | | | | | | 5,00 | 4,00 |
| Miristato de isopropilo | 2,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| TegoCare® 450 (Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate) | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| FASE HIDRÓFILA | | | | | | | | |
| Goma xantana | 0,30 | 0,35 | 0,40 | 0,40 | 0,35 | 0,40 | 0,40 | 0,40 |
| Glicerina | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| Metilparabeno | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,20 | 0,20 |
| Propilparabeno | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,10 | 0,10 |
| EDTA | | | | | | | 0,10 | 0,10 |
| Água | q.b.p 100,00 | q.b.p 100,00 | q.b.p 100,00 | q.b.p 100,00 | q.b.p 100,00 | q.b.p 100,00 | q.b.p 100,00 | q.b.p 100,00 |

Durante a fase de desenvolvimento de formulação foram testadas diferentes fórmulas (Tabela 8). Após preparação da fórmula F1 verificou-se que esta apresentava uma consistência muito líquida, necessitando de ser otimizada. Neste sentido, diferentes fórmulas foram preparadas (F2-F8).

Após avaliação das diferentes fórmulas preparadas foi F7 a que reuniu a consistência mais adequada bem como as melhores propriedades sensoriais, nomeadamente suavidade após aplicação e menor oleosidade, tendo sido deste modo a fórmula escolhida como creme base.

Tabela 9 – Diferentes fragrâncias testadas.

| FRAGRÂNCIA | CONCENTRAÇÃO (%) | PREFERÊNCIA (nº pessoas/nº total) |
|-------------------|-------------------------|--|
| Silk and Velvet | 0,05% | 0/7 |
| | 0,10% | 2/7 |
| Fleur | 0,05% | 0/7 |
| | 0,10% | 0/7 |
| Van Elégance | 0,05% | 0/7 |
| | 0,10% | 3/7 |
| Nival | 0,05% | 1/7 |
| | 0,10% | 0/7 |
| Amanda | 0,05% | 0/7 |
| | 0,10% | 0/7 |

Foram testadas diferentes fragrâncias a diferentes concentrações no creme base (Tabela 9), as quais foram dadas a um grupo de sete pessoas para elegerem qual a fragrância e a concentração “mais agradável”, considerando que o produto final seria um creme de rosto. A fragrância Van Elégance a 0,1% foi aquela cujo maior número de pessoas declarou como o odor mais agradável para um creme de rosto.

2.2.2 Estudo de estabilidade

2.2.2.1 Centrifugação

Após os dois ciclos de centrifugação a amostra não apresentou alterações.

2.2.2.2 Análise das características organoléticas

Tabela 10 – Resultados da avaliação das características organoléticas da amostra de creme base submetida a estudos de estabilidade.

| CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS | ESPECIFICAÇÃO | APÓS PREPARAÇÃO | 1 MÊS | | 3 MESES | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|---|-----------------------|---|
| | | | TEMPERATURA AMBIENTE | 40°C | TEMPERATURA AMBIENTE | 40°C |
| ASPECTO | Homogêneo | Normal, sem alteração | Normal, sem alteração | Modificado (película seca na superfície) | Normal, sem alteração | Modificado (película seca na superfície) |
| COR | Branco | Normal, sem alteração | Normal, sem alteração | Ligeiramente modificado (amarelado) | Normal, sem alteração | Modificado (amarelado) |
| ODOR | Característico à fragrância | Normal, sem alteração | Normal, sem alteração | Ligeiramente modificado (odor a fragrância menos intenso) | Normal, sem alteração | Ligeiramente modificado (odor a fragrância menos intenso) |

As amostras de creme base armazenadas à temperatura ambiente não apresentaram alterações organoléticas durante os 90 dias de ensaio. Pelo contrário, as amostras armazenadas a 40°C apresentaram alterações na cor, no aspecto e no odor ao fim de 30 dias e ao fim de 90 dias, conforme descrito na Tabela 10.

2.2.2.3 Avaliação do pH

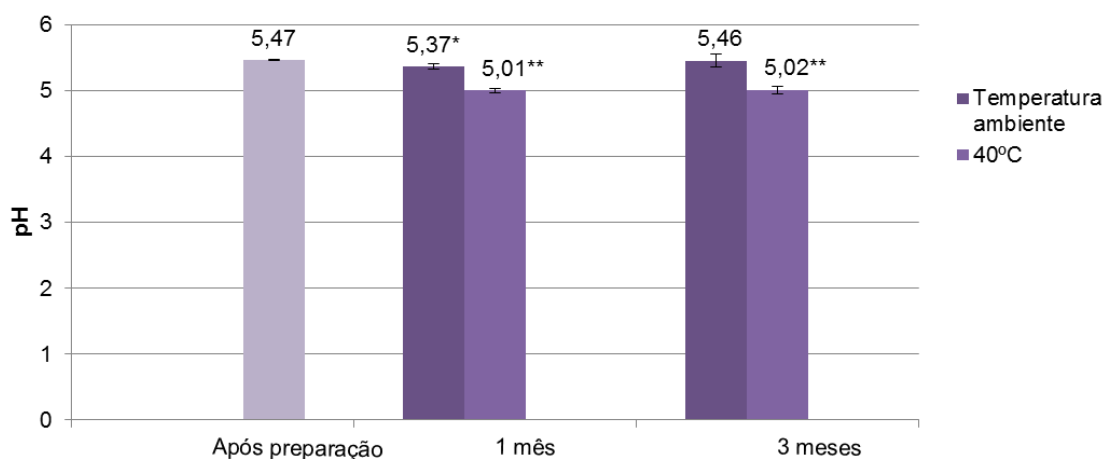


Figura 14 – Gráfico de barras com os resultados da avaliação do pH da amostra de creme base submetida a estudos de estabilidade.

*p < 0,10; ** p≤0,01

O pH das amostras de creme base armazenadas à temperatura ambiente demonstrou ter sofrido uma diminuição quase significativa ao fim de um mês (p = 0,075) e

não significativa no final dos 90 dias de ensaio (Figura 14). Relativamente às amostras de creme base armazenadas a 40°C verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa do pH, tanto ao fim de um mês ($p = 0,003$) como ao fim de três meses ($p < 0,01$). Apesar desta diminuição o creme manteve-se dentro da especificação estabelecida para este produto.

2.2.2.4 Determinação da viscosidade

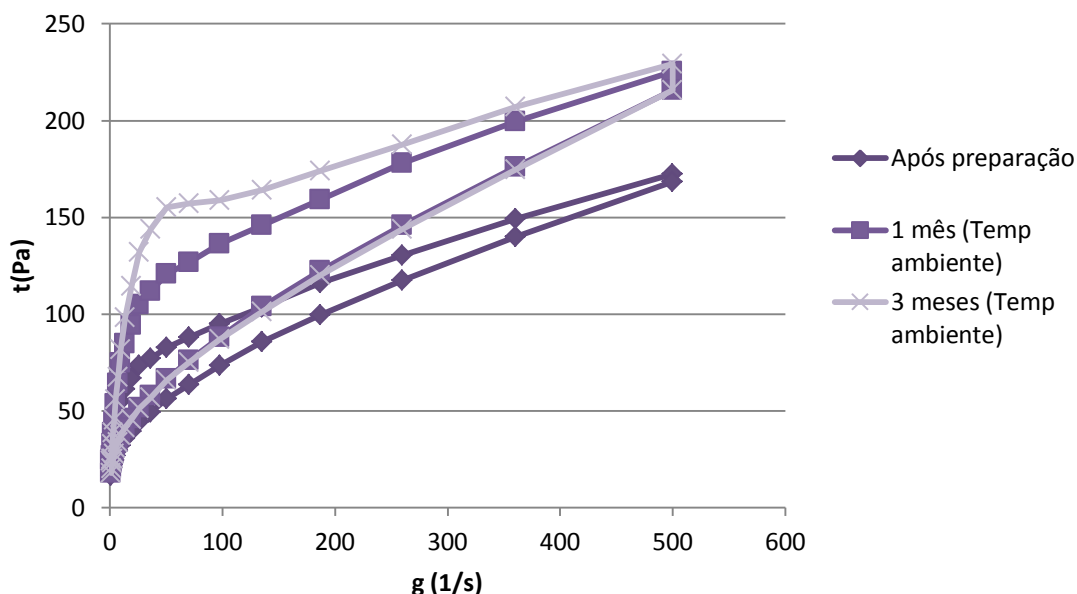


Figura 15 – Reograma da amostra de creme base armazenada à temperatura ambiente.

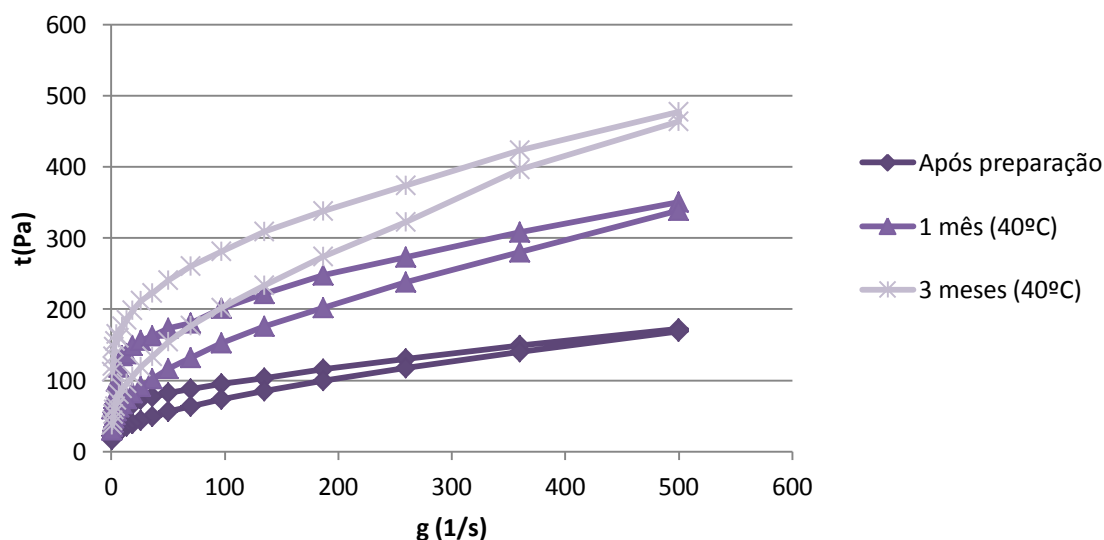


Figura 16 – Reograma da amostra de creme base armazenada a 40°C.

As Figuras 15 e 16 representam os gráficos da tensão de corte *versus* a razão de corte das amostras de creme base armazenadas à temperatura ambiente e 40°C ao

longo do estudo de estabilidade. Pela análise dos gráficos pode verificar-se que o creme base é considerado um fluido não-Newtoniano, de comportamento pseudoplástico ou reofluidificante. Verifica-se também que a formulação em estudo apresenta tixotropia.

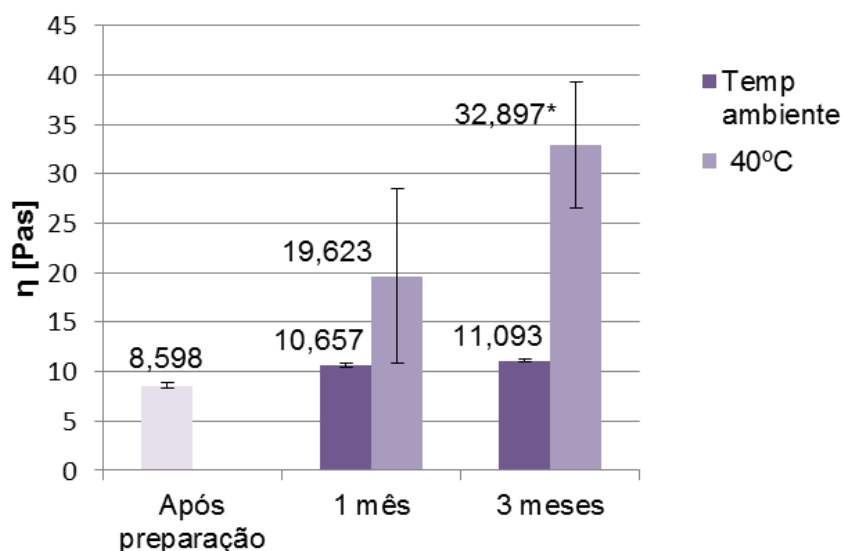


Figura 17 – Gráfico de barras ilustrando a variação da viscosidade, à velocidade de deformação em corte 5,027 s⁻¹, do creme base ao longo do estudo de estabilidade.

*p ≤ 0,05

Ao longo do estudo de estabilidade verificou-se um aumento da viscosidade aparente (velocidade de deformação em corte: 5,027 s⁻¹) para as amostras armazenadas a 40°C (Figura 17). Contudo, este aumento apenas demonstrou ser estaticamente significativo para a amostra armazenada a 40°C durante três meses (p = 0,021).

Para inferir o tipo de escoamento foram testados diferentes modelos reológicos, sendo que o modelo que melhor caracteriza o creme base é o modelo da Lei de potência ou modelo Oswald-de-Waele (Equação 1).

$$\tau = K(\dot{\gamma})^n$$

Equação 1

Tabela 11 – Parâmetros reológicos do creme base ao longo do estudo de estabilidade.

| Amostra | | K - Coeficiente de consistência | n – Índice de escoamento | R ² |
|-----------------|---------------|---------------------------------|--------------------------|----------------|
| Após preparação | | 25,97 | 0,23 | 0,99 |
| 1 mês | Temp ambiente | 35,27 | 0,30 | 0,94 |
| | 40°C | 62,86 | 0,28 | 0,98 |
| 3 meses | Temp ambiente | 43,94 | 0,27 | 0,94 |
| | 40°C | 102,53 | 0,24 | 0,97 |

Pela análise da Tabela 11 é possível confirmar que o creme base apresenta um escoamento reofluidificante e que há um aumento da sua consistência ao longo do estudo de estabilidade.

2.2.3 Avaliação do efeito sobre as propriedades mecânicas da pele

2.2.3.1 R0 (Uf - Deformação total da pele)

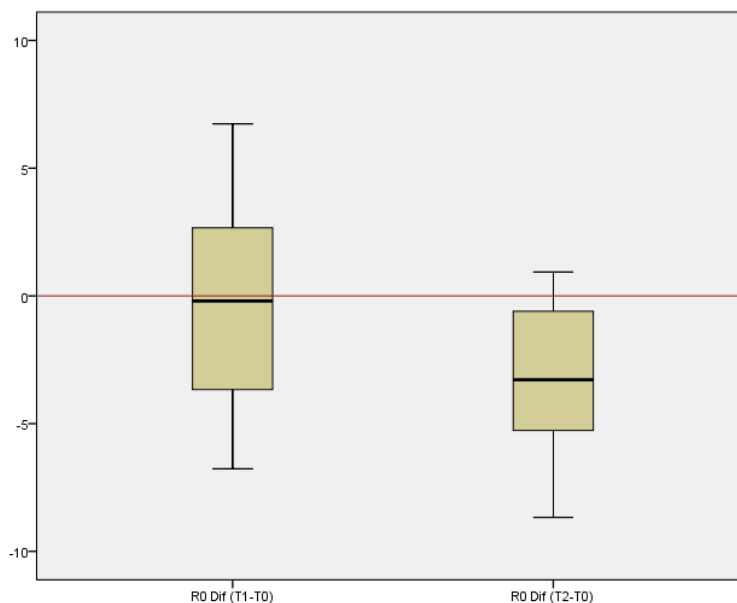


Figura 18 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do parâmetro R0 em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Na Figura 18 encontram-se representadas as diferenças, ao fim de um mês e ao fim de dois meses, para o parâmetro R0. Ambas as diferenças seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

Na Tabela 12 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois meses da utilização do mesmo. Verifica-se que ao fim de um mês não foram registadas

alterações significativas, mas ao fim de dois meses pode concluir-se que houve uma diminuição estatisticamente muito significativa da extensibilidade da pele (Uf), a qual ocorreu em 92% dos voluntários.

Tabela 12 – Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o parâmetro R0 (n = 26).

| R0 (mm) (Uf - Deformação total da pele) | | | |
|--|-------------|--------------|------------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média ± DP | 0,15 ± 0,03 | 0,15 ± 0,04 | 0,12 ± 0,03 |
| Diferenças médias ± DP | | 0,00 ± 0,04 | -0,03 ± 0,03 |
| Diferenças médias (%) ± DP | | 1,08 ± 25,98 | -20,78 ± 15,58 |
| Nr. de voluntários com diminuição do R0 | | 13 | 24 |
| % de voluntários com diminuição do R0 | | 50,00 | 92,31 |
| Diminuição máxima (%) | | -30,89 | -43,37 |
| Teste t de <i>Student</i> : valor de p | | 0,946 | <0,001 |

2.2.3.2 R5 (Ur/Ue – Relação de deformação elástica)

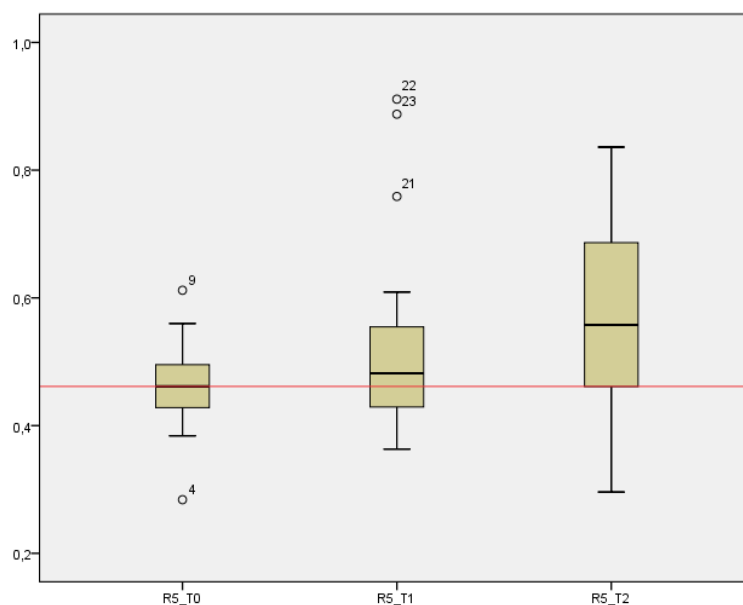


Figura 19 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores do parâmetro R5 no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Na Figura 19 encontram-se representados os valores relativos ao parâmetro R5 ao longo do estudo. A amostra correspondente ao T1 (um mês) segue uma distribuição não

normal, enquanto as amostras T0 (início do estudo) e T2 (dois meses) seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

Na Tabela 13 encontram-se representados os resultados obtidos nos diferentes tempos do estudo bem como as diferenças. Verifica-se, uma vez mais, também para este parâmetro que ao fim de um mês não foram registadas alterações significativas. No entanto, ao fim de dois meses é possível registar um aumento estatisticamente muito significativo deste parâmetro, o qual ocorreu em 73% das voluntárias.

Tabela 13 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o parâmetro R5 (n = 26).

| R5 (Ur/Ue – Relação de deformação elástica) | | | |
|--|-------------|---------------|---------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média ± DP | 0,47 ± 0,07 | 0,52 ± 0,14 | 0,57 ± 0,15 |
| Diferenças médias ± DP | | 0,05 ± 0,14 | 0,11 ± 0,16 |
| Diferenças médias (%) ± DP | | 11,79 ± 29,09 | 25,65 ± 38,50 |
| Nr. de voluntários com aumento do R5 | | 17 | 19 |
| % de voluntários com aumento do R5 | | 65,38 | 73,08 |
| Aumento máximo (%) | | 93,25 | 121,48 |
| Teste não-paramétrico para amostras emparelhadas (Teste de Wilcoxon): valor de p | | 0,135 | 0,004 |

2.2.3.3 R7 (Ur/Uf – Parâmetro de firmeza)

Na Figura 20 encontram-se representadas as diferenças, ao fim de um mês e ao fim de dois meses, para o parâmetro R7. Ambas as diferenças seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

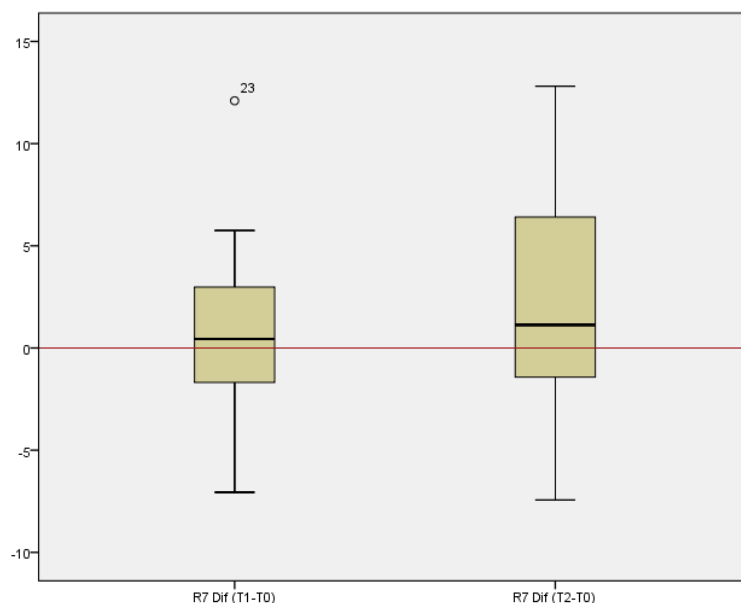


Figura 20 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do parâmetro R7 em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Na Tabela 14 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois meses da utilização do mesmo. Verifica-se que ao fim de um mês de utilização do produto teste não ocorreram alterações significativas deste parâmetro. Ao fim de dois houve um ligeiro aumento da razão Ur/Uf (R7), o qual demonstrou ser estatisticamente quase significativo.

Tabela 14 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o parâmetro R7 (n = 26).

| R7 (Ur/Uf – Parâmetro de firmeza) | | | |
|---|-----------------|------------------|------------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média \pm DP | 0,25 \pm 0,04 | 0,25 \pm 0,04 | 0,27 \pm 0,05 |
| Diferenças médias \pm DP | | 0,01 \pm 0,04 | 0,02 \pm 0,05 |
| Diferenças médias (%) \pm DP | | 3,69 \pm 17,28 | 9,62 \pm 22,79 |
| Nr. de voluntários com aumento do R7 | | 15 | 17 |
| % de voluntários com aumento do R7 | | 57,69 | 65,38 |
| Aumento máximo (%) | | 60,12 | 57,82 |
| Teste t de Student: valor de p | | 0,420 | 0,069 |

2.2.4 Avaliação do efeito sobre o relevo da pele

2.2.4.1 Volume das cavidades

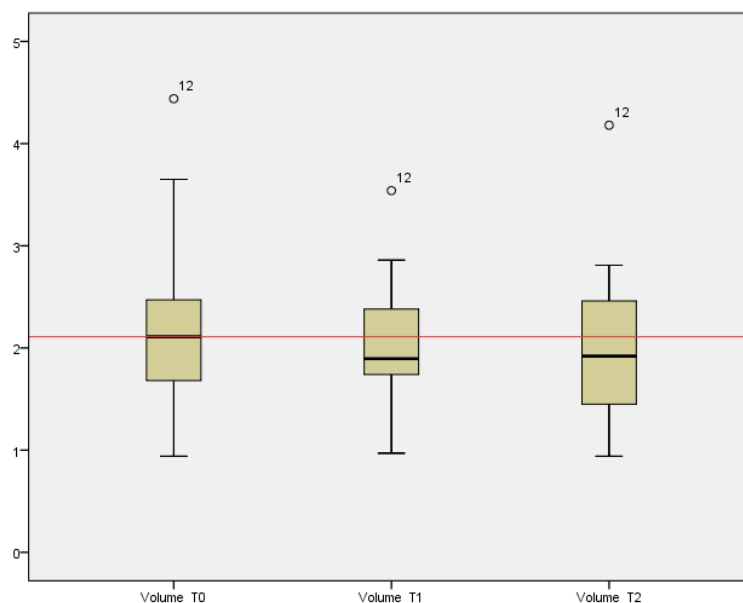


Figura 21 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores de volume das cavidades no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Tabela 15 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o volume das cavidades (n = 26).

| Volume das cavidades (mm ³) | | | |
|---|-------------|---------------|---------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média ± DP | 2,17 ± 0,76 | 2,03 ± 0,59 | 2,01 ± 0,69 |
| Diferenças médias ± DP | | -0,14 ± 0,39 | -0,15 ± 0,44 |
| Diferenças médias (%) ± DP | | -4,33 ± 13,08 | -5,43 ± 15,52 |
| Nr. de voluntários com diminuição do volume | | 13 | 15 |
| % de voluntários com diminuição do volume | | 50,00 | 57,69 |
| Diminuição máxima (%) | | -40,91 | -49,82 |
| Teste t de <i>Student</i> para amostras emparelhadas: valor de p | | 0,072 | 0,090 |

Na Figura 21 encontram-se representados os valores relativos ao parâmetro “volume das cavidades” ao longo do estudo, ou seja, relativos ao volume das cavidades da pele calculado com base nos perfis de altura abaixo do plano de referência. Todas as amostras correspondentes aos diferentes tempos seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

Na Tabela 15 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois meses da utilização do mesmo. Verifica-se que ao longo do estudo houve uma diminuição quase significativa do volume das cavidades da área periocular.

2.2.4.2 Rugosidade aritmética

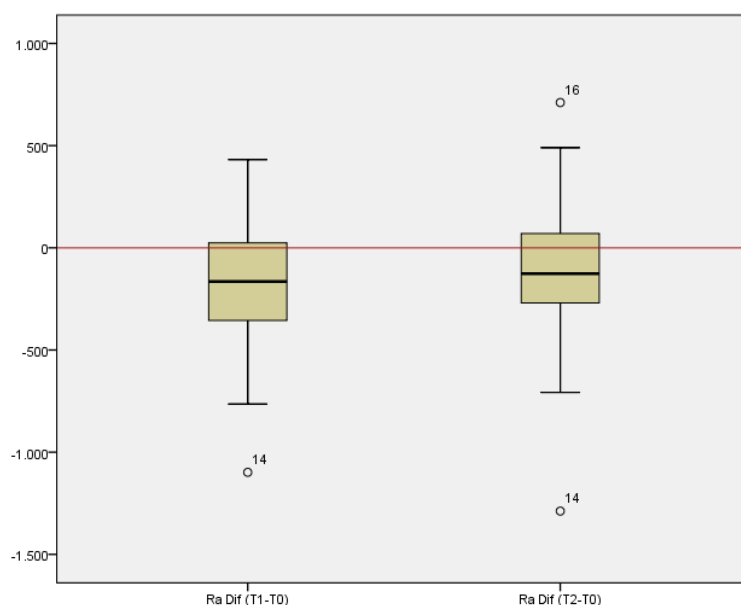


Figura 22 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do parâmetro Ra em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Tabela 16- Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a rugosidade aritmética (Ra) (n = 26).

| Ra (µm) | | | |
|---|--------------|---------------|---------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média ± DP | 21,78 ± 4,63 | 20,40 ± 3,39 | 20,58 ± 3,92 |
| Diferenças médias ± DP | | -1,38 ± 3,59 | -1,20 ± 4,13 |
| Diferenças médias (%) ± DP | | -4,72 ± 14,36 | -3,87 ± 16,75 |
| Nr. de voluntários com diminuição da Ra | | 18 | 19 |
| % de voluntários com diminuição da Ra | | 69,23 | 73,08 |
| Diminuição máxima (%) | | -31,98 | -37,50 |
| Teste t de Student: valor de p | | 0,061 | 0,152 |

Na Figura 22 encontram-se representadas as diferenças, ao fim de um mês e ao fim de dois meses, para o parâmetro Ra (rugosidade aritmética). Ambas as diferenças seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

Na Tabela 16 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois meses da utilização do mesmo. Tal como para o volume das cavidades verifica-se uma diminuição quase significativa da rugosidade da pele ao fim de um mês, mas sem significado estatístico ao fim de dois meses comparativamente ao início do estudo.

2.2.4.3 Profundidade das rugas

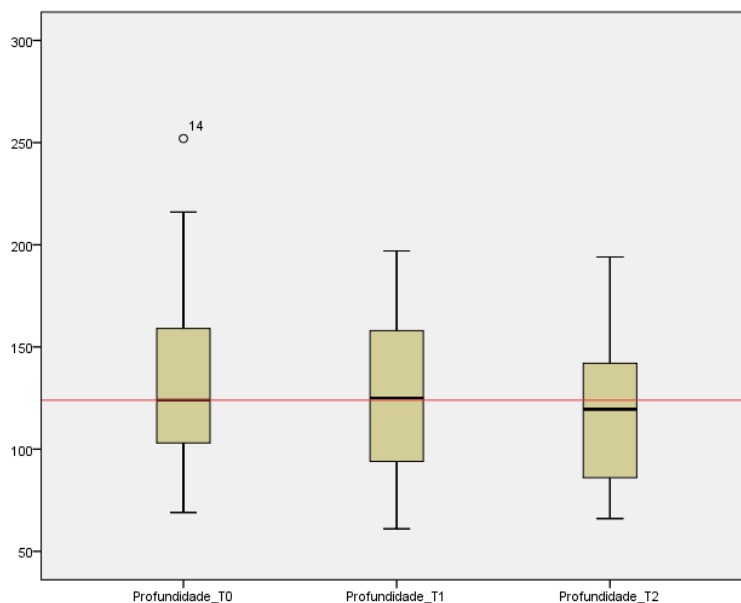


Figura 23 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores de profundidade das rugas no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Na Figura 23 encontram-se representados os valores relativos à profundidade média das rugas de cada voluntária ao longo do estudo. Todas as amostras correspondentes aos diferentes tempos seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

Na Tabela 17 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois meses da utilização do mesmo. Em algumas voluntárias foi observada uma diminuição da profundidade das rugas (Figura 24 e 25). Contudo, estas observações não podem ser atribuídas ao produto teste, uma vez que não foram registadas diferenças significativas nos valores médios da profundidade das rugas após um mês e dois meses da sua utilização.

Tabela 17 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a profundidade das rugas (n = 26).

| Profundidade das rugas (µm) | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média ± DP | 133,38 ± 47,33 | 125,92 ± 39,42 | 124,96 ± 38,61 |
| Diferenças médias ± DP | | -7,46 ± 24,35 | -8,42 ± 27,67 |
| Diferenças médias (%) ± DP | | -3,41 ± 15,74 | -4,01 ± 14,51 |
| Nr. de voluntários com diminuição da profundidade | | 14 | 14 |
| % de voluntários com diminuição da profundidade | | 53,85 | 53,85 |
| Diminuição máxima (%) | | -42,65 | -44,05 |
| Teste t de <i>Student</i> para amostras emparelhadas: valor de p | | 0,146 | 0,133 |

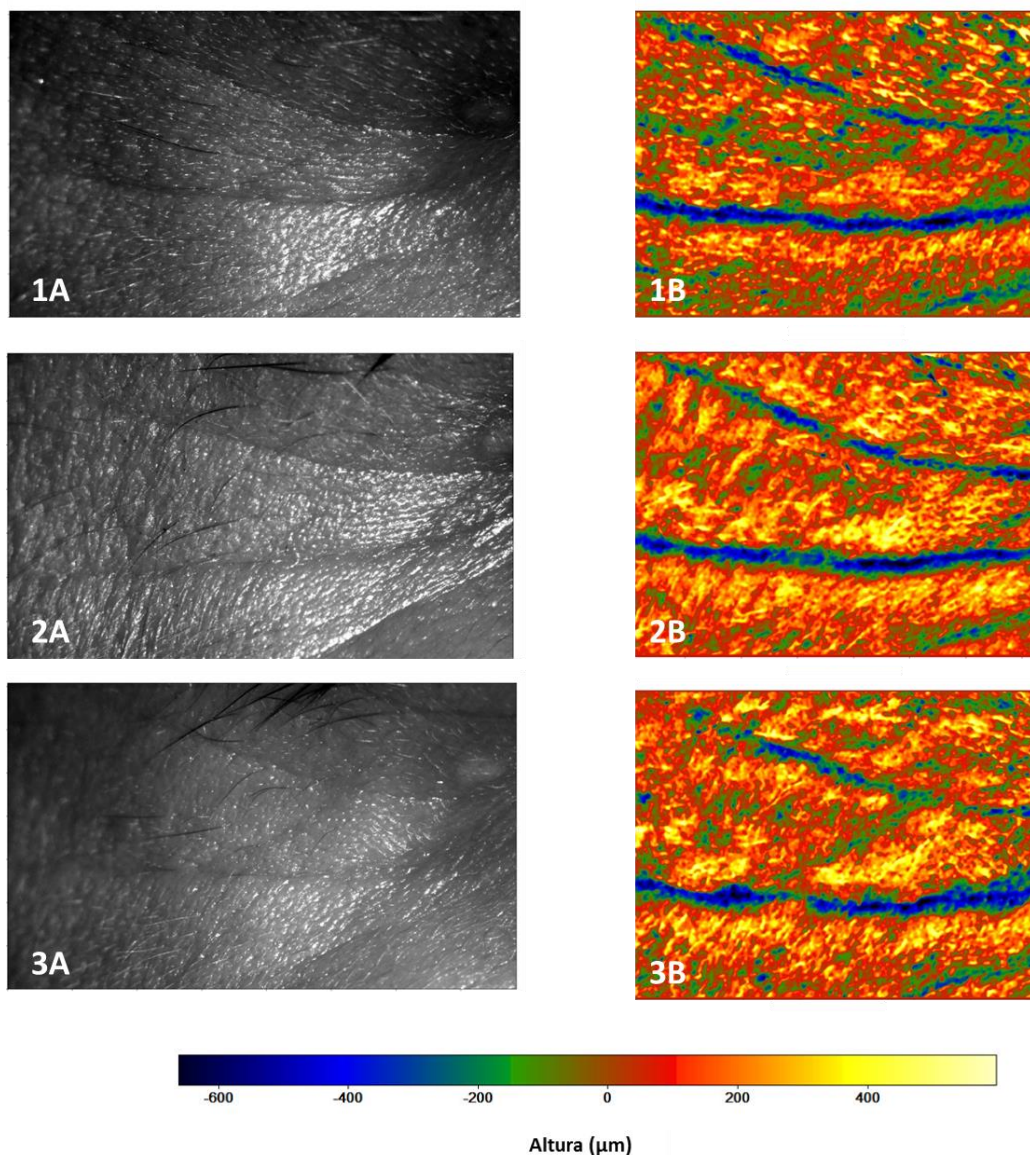


Figura 24 – Fotografias da zona periocular designada de “pés de galinha” adquiridas com o equipamento PRIMOS™ de uma das voluntárias que apresentou diminuição da profundidade das rugas.

(A) Fotografia. (B) representação do relevo numa imagem colorida, onde cada cor corresponde a uma altura (valores positivos) ou profundidade (valores negativos) em relação ao plano de referência, demonstrando a diminuição da profundidade das rugas ao longo do estudo.

1 – Antes do início do estudo; 2- Um mês após aplicação do produto em estudo; 3- Dois meses após aplicação do produto em estudo.

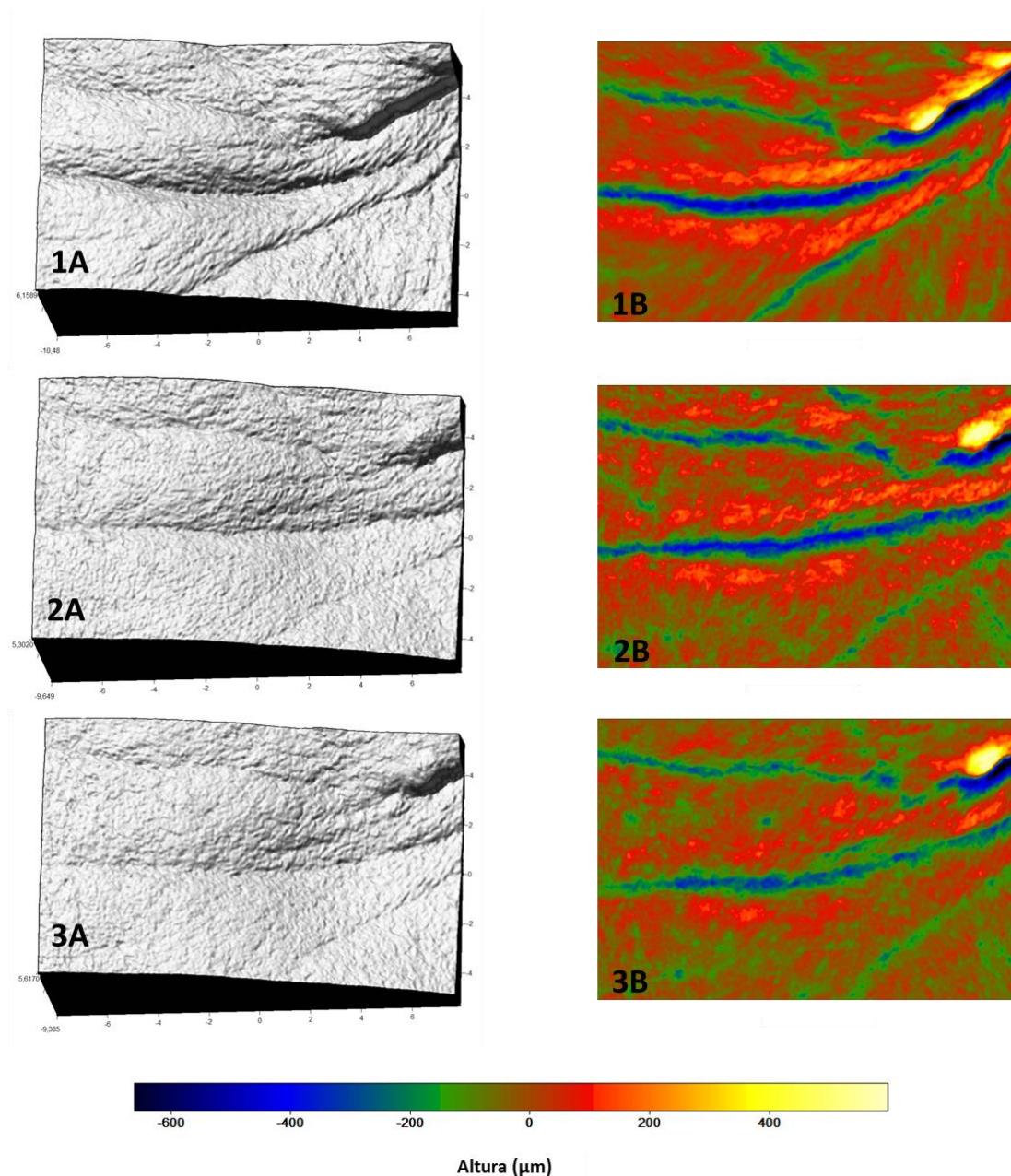


Figura 25 – Imagens 3D da zona periocular designada de “pés de galinha” adquiridas com o equipamento PRIMOS™ de uma das voluntárias que apresentou diminuição da profundidade das rugas.

(A) Representação tridimensional. (B) representação do relevo desta zona numa imagem colorida, onde cada cor corresponde a uma altura (valores positivos) ou profundidade (valores negativos) em relação ao plano de referência, demonstrando a diminuição da profundidade das rugas ao longo do estudo.

1 – Antes do início do estudo; 2- Um mês após aplicação do produto em estudo; 3- Dois meses após aplicação do produto em estudo.

2.2.5 Quantificação das fibras de colagénio e observação da pele em profundidade

2.2.5.1 Perímetro dos “objetos” (fibras)

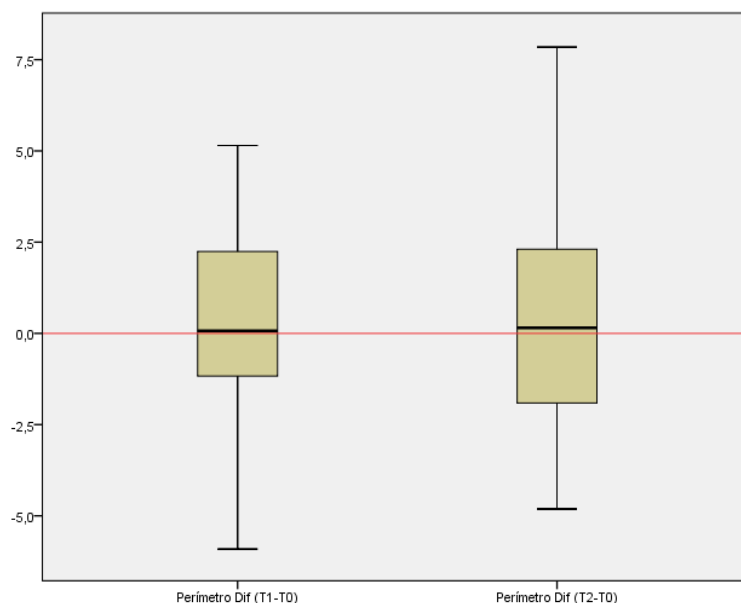


Figura 26 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças do perímetro dos “objetos” (fibras de colagénio) a em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Na Figura 26 encontram-se representadas as diferenças, ao fim de um mês e ao fim de dois meses para o perímetro dos “objetos” analisados. Ambas as diferenças seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

Na Tabela 18 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois meses da utilização do mesmo. Não foram registadas alterações significativas para este parâmetro ao longo do estudo.

Tabela 18 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para o perímetro médio dos “objetos” analisados (fibras de colagénio) (n = 26).

| Perímetro médio (µm) | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média ± DP | 30,37 ± 3,87 | 30,39 ± 3,90 | 30,91 ± 4,37 |
| Diferenças médias ± DP | | 0,01 ± 2,78 | 0,54 ± 3,27 |
| Diferenças médias (%) ± DP | | 0,51 ± 9,46 | 2,13 ± 10,77 |
| Nr. de voluntários com aumento do perímetro | | 13 | 14 |
| % de voluntários com aumento do perímetro | | 50,00 | 53,85 |
| Aumento máximo (%) | | 23,69 | 28,05 |
| Teste t de <i>Student</i> para amostras emparelhadas: valor de p | | 0,980 | 0,406 |

2.2.5.2 Área dos “objetos” (fibras)

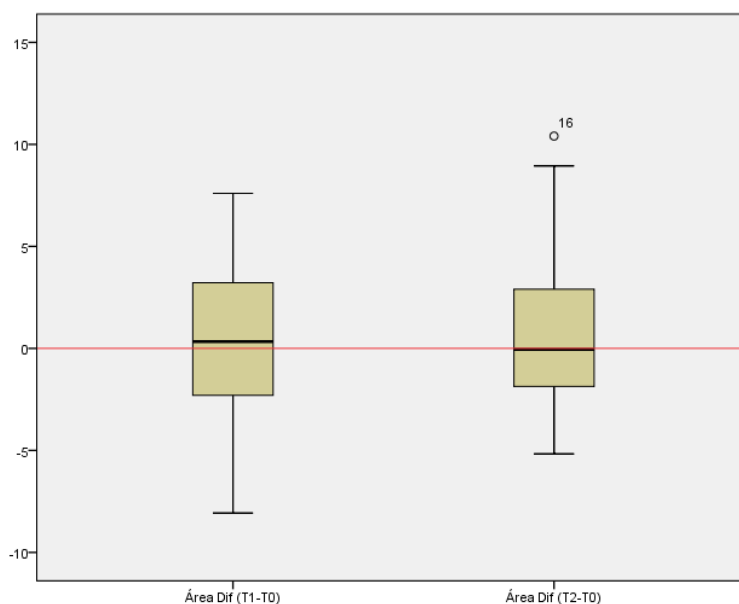


Figura 27 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos das diferenças da área dos “objetos” (fibras de colagénio) em relação ao início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Na Figura 27 encontram-se representadas as diferenças, ao fim de um mês e ao fim de dois meses para a área dos “objetos” analisados. Ambas as diferenças seguem uma distribuição normal (Anexo IV).

Na Tabela 19 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois

meses da utilização do mesmo. As diferenças são praticamente nulas ao longo do estudo.

Tabela 19 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a área média dos “objetos” analisados (fibras de colagénio) (n = 26).

| Área média (μm^2) | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média \pm DP | 34,33 \pm 5,16 | 34,43 \pm 5,33 | 34,96 \pm 5,76 |
| Diferenças médias \pm DP | | 0,10 \pm 3,80 | 0,63 \pm 4,19 |
| Diferenças médias (%) \pm DP | | 0,98 \pm 11,90 | 2,30 \pm 12,45 |
| Nr. de voluntários com aumento da área | | 14 | 12 |
| % de voluntários com aumento da área | | 53,85 | 46,15 |
| Aumento máximo (%) | | 33,59 | 33,69 |
| Teste t de Student: valor de p | | 0,894 | 0,453 |

2.2.5.3 Índice de fragmentação A

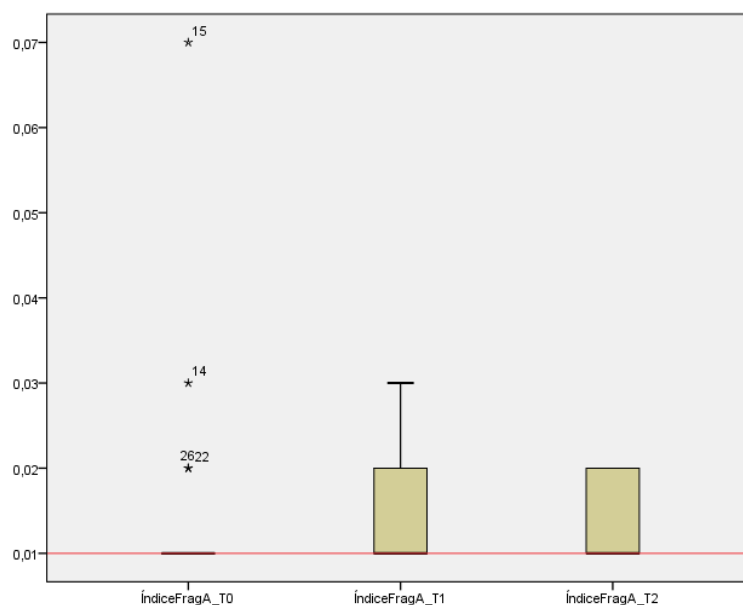


Figura 28 - Gráficos de caixa de bigodes ilustrativos dos valores do Índice de fragmentação A (área) no início do estudo, um mês e dois meses após utilização do produto teste.

Na Figura 28 encontram-se representados os valores relativos ao Índice de fragmentação A. Todas as amostras correspondentes aos diferentes tempos seguem uma distribuição não normal (Anexo IV).

Tabela 20 - Resultados obtidos antes da utilização do produto teste (T0), um mês (T1M) e dois meses (T2M) após aplicação do mesmo para a o Índice de fragmentação A (n = 26).

| Índice de fragmentação A | | | |
|--|-------------|---------------|---------------|
| | T0 | T1M | T2M |
| Média ± DP | 0,01 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 |
| Diferenças médias ± DP | | 0,00 ± 0,01 | 0,00 ± 0,01 |
| Diferenças médias (%) ± DP | | 42,79 ± 88,60 | 34,20 ± 80,86 |
| Nr. de voluntários com diminuição do Índice de fragmentação A | | 7 | 11 |
| % de voluntários com diminuição do Índice de fragmentação A | | 26,92 | 42,31 |
| Diminuição máxima (%) | | -62,86 | -72,86 |
| Teste não-paramétrico para amostras emparelhadas (Teste de Wilcoxon): valor de p | | 0,341 | 0,675 |

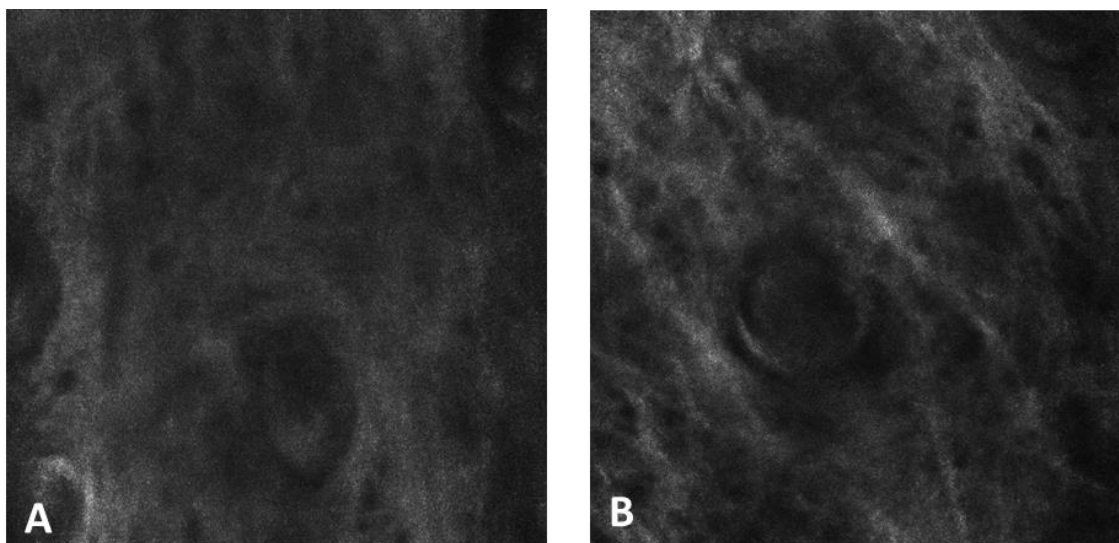


Figura 29 – Imagem da zona periocular ao nível da derme obtida com o microscópio confocal. A) antes da aplicação do produto teste. B) dois meses após a aplicação do produto teste.

Antes do início do estudo o colagénio é visualizado como uma massa amorfa e hiporefletiva onde não é possível observar fibras de colagénio individualizadas. Após dois meses é possível observar uma derme mais brilhante com algumas fibras individualizadas.

Na Tabela 20 encontram-se representados os resultados obtidos para este parâmetro no início do estudo, após um mês da utilização do produto teste e após dois meses da utilização do mesmo. Não foram observadas alterações ao longo do estudo no que diz respeito ao Índice de fragmentação A. Este índice estabelece uma relação entre o número de objetos detetados numa imagem e a sua área: é tanto maior quanto maior o

número de objetos presentes na imagem e menor a sua área. Dá-nos uma ideia do estado de fragmentação da matriz dérmica.

As imagens 29, 30 e 31 correspondem a imagens adquiridas, durante o estudo, com o microscópio confocal VivaScope® 1500 onde é possível visualizar diferenças na arquitetura da derme.

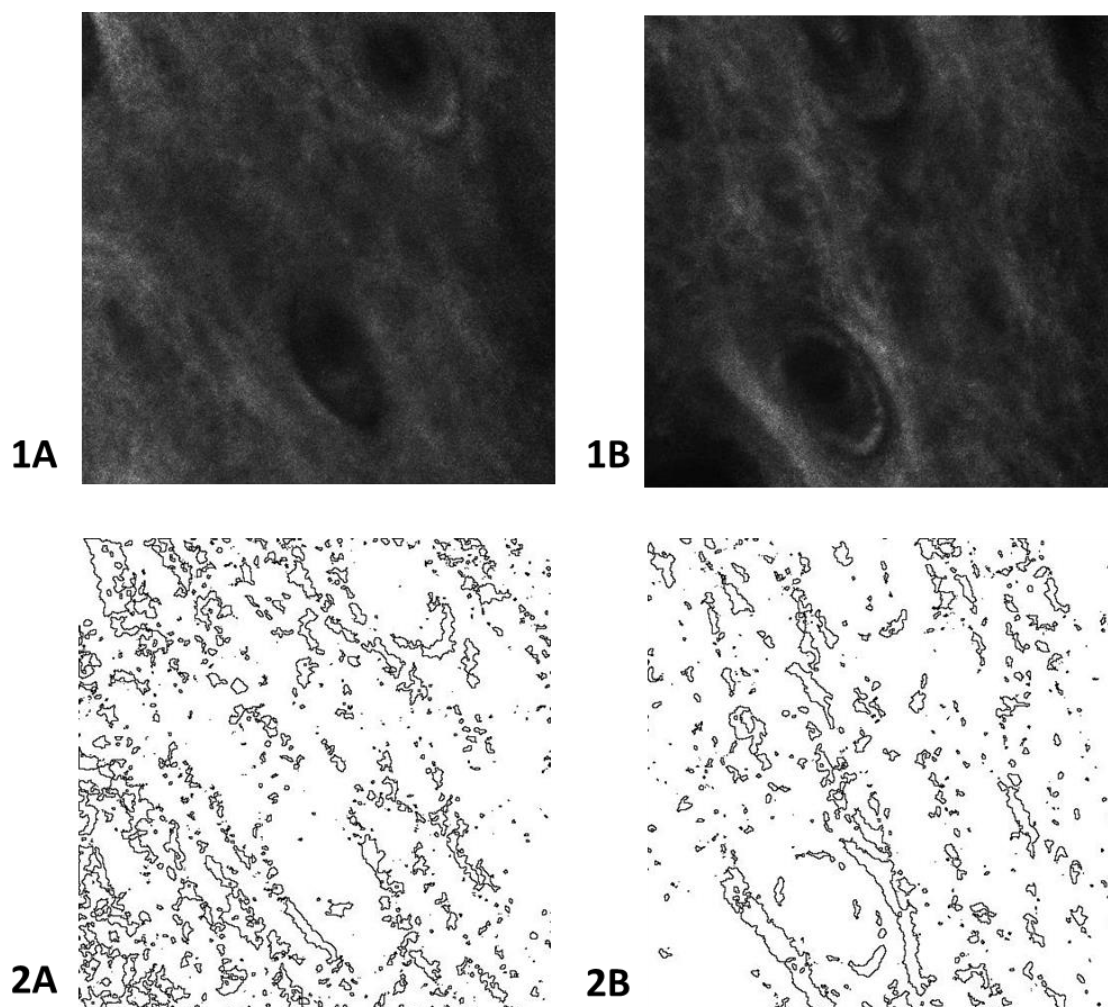


Figura 30 - Imagens da zona periocular ao nível da derme obtidas com o microscópio confocal e, após processamento com o *software* Confoscan indicando o nível de fragmentação antes e após o tratamento com o produto teste.

1A) Imagem confocal da derme antes da aplicação do produto teste (500µm x 500µm); 2A) Textura da derme antes da aplicação do produto teste, processada com o *software* Confoscan; 1B) Imagem confocal da derme após dois meses da aplicação do produto teste (500µm x 500µm); 2B) Textura da derme após dois meses da aplicação do produto teste, processada com o *software* Confoscan.

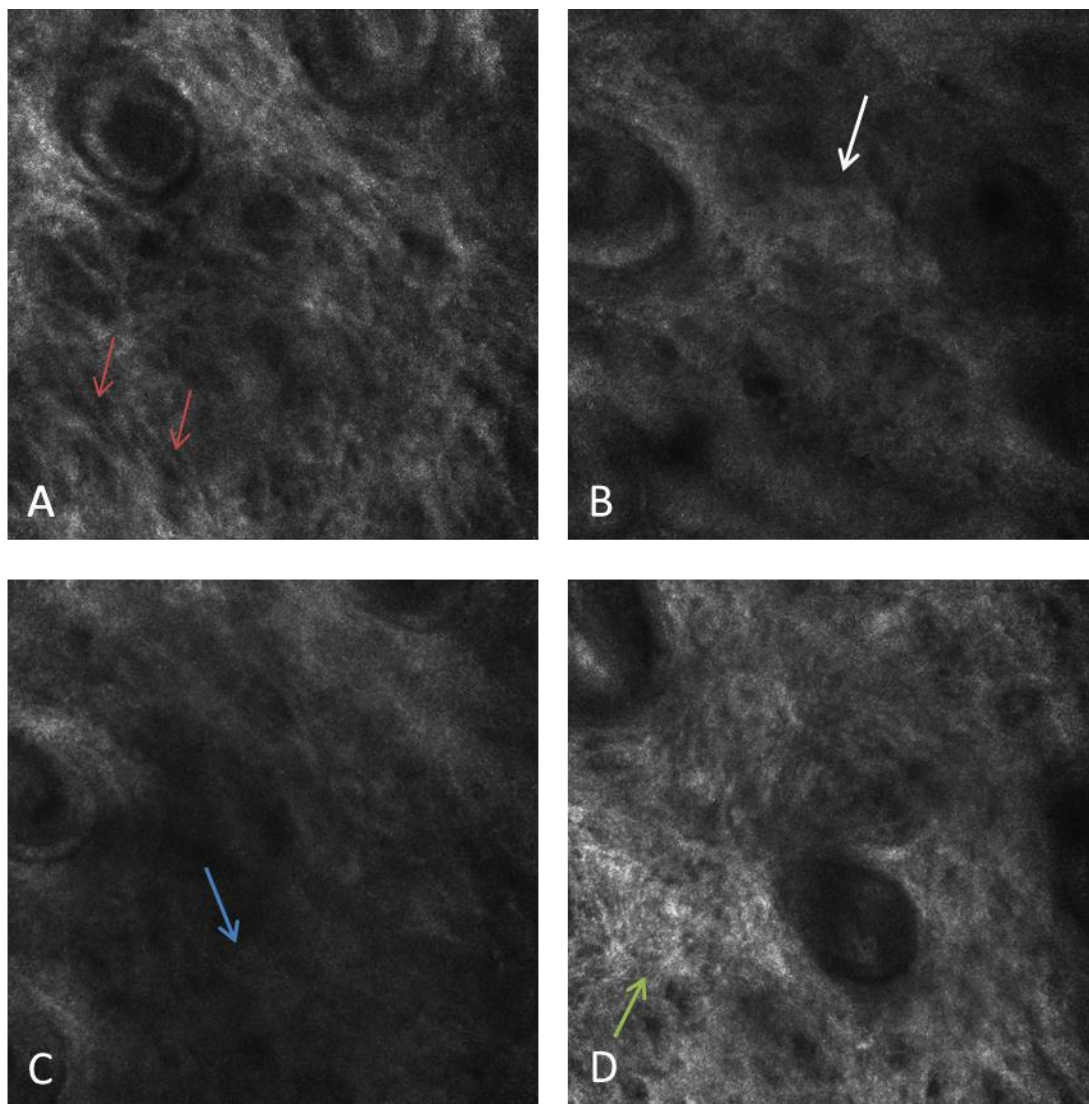






































Figura 31 – Imagens confocais representativas de diferentes arquiteturas da matriz dérmica observadas em diferentes voluntárias que participaram no estudo.

(A) Pequenas e reticuladas fibras de colagénio com brilho (setas vermelhas). (B) Colagénio espesso disposto de forma grosseira (seta branca). (C) Amontoados de colagénio constituídos por material amorfo e hiporreflector (seta azul). (D) Fibras onduladas altamente refletoras que correspondem a fibras elásticas, elastose (seta verde).

2.2.6 Correlações de todas as variáveis





































Tabela 21 – Correlações entre os diversos parâmetros obtidos com os equipamentos Cutometer® MPA 580, PRIMOS™ premium e VivaScope® 1500 antes do início do estudo e, respectivas representações gráficas.

| | | R0_T0 | R5_T0 | R7_T0 | Volume_T0 | Ra_T0 | Profundidade_T0 | Perímetro_T0 | Área_T0 | ÍndiceFragA_T0 |
|-----------------|-----------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|----------------|
| R0_T0 | Correlação de Pearson | | -,212 | ,025 | -,023 | -,006 | -,125 | ,223 | ,244 | ,323 |
| | Sig. (2 extremidades) | | ,299 | ,905 | ,912 | ,977 | ,542 | ,273 | ,230 | ,107 |
| | N | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| R5_T0 | Correlação de Pearson |  | | ,857** | -,220 | ,084 | -,152 | -,101 | -,092 | -,077 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | ,000 | ,280 | ,682 | ,458 | ,624 | ,655 | ,708 |
| | N | | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| R7_T0 | Correlação de Pearson |  |  | | -,327 | ,010 | -,347 | ,041 | ,047 | ,125 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | ,103 | ,962 | ,083 | ,843 | ,821 | ,544 |
| | N | | | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| Volume_T0 | Correlação de Pearson |  |  |  | | ,788** | ,778** | -,027 | -,021 | ,163 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | ,000 | ,000 | ,897 | ,917 | ,426 |
| | N | | | | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| Ra_T0 | Correlação de Pearson |  |  |  |  | | ,715** | ,106 | ,109 | ,233 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | ,000 | ,605 | ,594 | ,253 |
| | N | | | | | | 26 | 26 | 26 | 26 |
| Profundidade_T0 | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  | | -,144 | -,144 | ,063 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | ,482 | ,482 | ,760 |
| | N | | | | | | | 26 | 26 | 26 |
| Perímetro_T0 | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  |  | | ,995** | ,147 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | | ,000 | ,473 |
| | N | | | | | | | | 26 | 26 |
| Área_T0 | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  |  |  | | ,190 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | | | ,353 |
| | N | | | | | | | | | 26 |
| ÍndiceFragA_T0 | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  |  |  |  | |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | | | |
| | N | | | | | | | | | |

Correlações significativas assinaladas na tabela com uma circunferência de cor vermelha.

**A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades = bilateral).

Tabela 22 – Correlações entre as diferenças antes e após o estudo dos diferentes parâmetros obtidos com os equipamentos Cutometer® MPA 580, PRIMOS™ premium e VivaScope® 1500 e, respectivas representações gráficas.

| | | R0 Dif (T2-T0) | R5 Dif (T2-T0) | R7 Dif (T2-T0) | Volume Dif (T2-T0) | Ra Dif (T2-T0) | Profundidade Dif (T2-T0) | Perímetro Dif (T2-T0) | Área Dif (T2-T0) | ÍndiceFrag A Dif (T2-T0) |
|--------------------------|-----------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|--------------------------|
| R0 Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson | | ,086 | ,219 | ,196 | ,259 | ,158 | -,438* | -,430* | -,124 |
| | Sig. (2 extremidades) | | ,677 | ,282 | ,338 | ,202 | ,440 | ,025 | ,028 | ,546 |
| | N | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| R5 Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  | | ,887** | -,195 | -,115 | -,215 | -,307 | -,258 | -,246 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | ,000 | ,340 | ,576 | ,291 | ,127 | ,204 | ,226 |
| | N | | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| R7 Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  |  | | -,122 | -,046 | -,163 | -,420* | -,390* | -,312 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | ,553 | ,823 | ,427 | ,033 | ,049 | ,121 |
| | N | | | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| Volume Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  |  |  | | ,878** | ,963** | ,091 | ,063 | ,022 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | ,000 | ,000 | ,659 | ,759 | ,916 |
| | N | | | | | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| Ra Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  |  |  |  | | ,805** | ,108 | ,081 | ,008 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | ,000 | ,601 | ,693 | ,969 |
| | N | | | | | | 26 | 26 | 26 | 26 |
| Profundidade Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  | | ,124 | ,096 | ,031 |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | ,547 | ,640 | ,880 |
| | N | | | | | | | 26 | 26 | 26 |
| Perímetro Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  |  | | ,989** | ,425* |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | | ,000 | ,031 |
| | N | | | | | | | | 26 | 26 |
| Área Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  |  |  | | ,490* |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | | | ,011 |
| | N | | | | | | | | | 26 |
| ÍndiceFragA Dif (T2-T0) | Correlação de Pearson |  |  |  |  |  |  |  |  | |
| | Sig. (2 extremidades) | | | | | | | | | |
| | N | | | | | | | | | |

Correlações significativas assinaladas na tabela com uma circunferência de cor vermelha.

*A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades = bilateral). **A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades = bilateral).

Pela análise das correlações obtidas (Tabela 21 e 22) com os diferentes equipamentos utilizados para a avaliação da eficácia do produto cosmético em estudo é possível verificar que, no início do estudo, as correlações existentes são entre parâmetros dos mesmos equipamentos e não entre parâmetros de diferentes equipamentos. Considerando os parâmetros obtidos com o equipamento Cutometer® e com microscópio confocal, após processamento com o *software* Confoscan, verifica-se que nem todos se correlacionam entre si. Apenas para o equipamento PRIMOS™ é demonstrado que todos os parâmetros que este permite extrair estão de certa forma relacionados entre si.

Se procurarmos correlações entre as diferenças registradas ao fim de dois meses da utilização do produto teste para os diferentes parâmetros é possível verificar que as correlações já notadas no início do estudo se tornam mais fortes e são registradas novas correlações entre alguns dos dados que são obtidos com o microscópio confocal, após análise com o *software* Confoscan, e o equipamento Cutometer®, nomeadamente entre a área e o perímetro dos objetos analisados com o Confoscan e os parâmetros R0 e R5.

2.3 *Discussão*

Para veicular o péptido em estudo foi desenvolvido um creme hidrófilo de aspeto homogéneo, cor branca e com um leve odor à fragrância utilizada. Embora o desenvolvimento de formulação não fosse o principal objetivo desta dissertação o creme hidrófilo base para incorporação do ingrediente ativo foi desenvolvido exclusivamente para este estudo.

Foi testada uma primeira fórmula, F1 (Tabela 8), a qual apresentava uma consistência muito líquida necessitando de ser otimizada. Foi então preparada uma segunda fórmula, F2, em que foi alterada a proporção dos constituintes da fase hidrófoba e aumentada a concentração do agente viscosificante de fase externa (goma xantana). Também esta apresentava uma consistência que ainda não era a desejada para uma formulação de aplicação tópica. Foram então preparadas as fórmulas F3, F4 e F5, as quais apesar de apresentarem uma consistência mais próxima da desejada, quando aplicadas na pele não eram facilmente absorvidas notando-se um resíduo branco que parecia aumentar à medida que se espalhava o creme. Com o objetivo de verificar se este resíduo era provocado pelo álcool estearílico foi preparada uma outra fórmula, F6, em que este foi substituído por álcool cetílico. Apesar de menor, este resíduo era ainda perceptível e a consistência continuava a não ser a desejada. Assim, duas novas fórmulas, F7 e F8, foram preparadas para se otimizar a consistência e solucionar o problema do resíduo branco deixado na pele. Para aumentar a consistência foi introduzida uma cera, com um ponto de fusão mais elevado que o dos restantes constituintes da fase oleosa, uma vez que já não era possível aumentar-se a concentração do viscosificante de fase externa, sob pena de a formulação se tornar demasiado pegajosa. Como tentativa de solucionar o problema do resíduo branco foi alterada a proporção dos constituintes da fase hidrófoba.

De todas as fórmulas preparadas F7 foi aquela que reuniu a consistência mais adequada bem como as melhores propriedades sensoriais, nomeadamente suavidade após aplicação e menor oleosidade, razões pelas quais foi a fórmula escolhida para ser submetida a estudos de estabilidade.

Diferentes fragrâncias e concentrações foram também testadas (Tabela 9), sendo que a fragrância Van Elégance a 0,1% foi a que demonstrou ser mais apreciada por um grupo de sete pessoas que avaliaram o odor de diferentes lotes do creme base com as diferentes fragrâncias previamente selecionadas.

Do ponto de vista reológico o creme escolhido para incorporação do ingrediente ativo (F7) apresentava um comportamento reofluidificante, característico das pomadas, cremes e géis. Como referido anteriormente, o modelo que melhor se ajusta ao creme

desenvolvido para este estudo é o da lei de potência (Eq. 1). Valores de n menores que 1 comprovam o seu comportamento reofluidificante, em que para valores de temperatura constantes, a viscosidade diminui com o aumento da tensão de corte. Verificou-se também que esta formulação apresentava tixotropia, característica desejada numa formulação de aplicação tópica, uma vez que se pretende que esta se deforme durante a aplicação, ou seja, se torne mais fluída facilitando o espalhamento e, que recupere a sua viscosidade após aplicação permitindo que se mantenha no local de aplicação.

Como descrito anteriormente o creme base desenvolvido foi submetido a um estudo de estabilidade com duração de três meses, que teve como principal objetivo averiguar possíveis alterações na fórmula base que pudessem comprometer o estudo de avaliação de eficácia.

Ao longo deste estudo as amostras armazenadas à temperatura ambiente não apresentaram alterações em relação às características organoléticas, à viscosidade e ao pH, excetuando o valor pH medido ao fim de um mês que demonstrou uma diminuição quase significativa. Por outro lado, as amostras armazenadas em condições de temperatura mais extremas (estufa a 40°C) sofreram alterações tanto ao fim de um mês como de três meses. Ao nível das características organoléticas era visível a formação de uma camada amarelada e mais seca na superfície dos boiões em que o creme foi armazenado. Também ao nível do odor foi notada uma diminuição da intensidade da fragrância. Quanto ao pH houve uma diminuição que apesar de significativa se manteve dentro das especificações estabelecidas. A viscosidade registou um aumento significativo ao fim de três meses.

As alterações ocorridas estão muito provavelmente relacionadas com a embalagem em que foi acondicionado o creme, pois tratava-se de um boião de plástico não completamente estanque. Neste sentido, e para se averiguar quais as causas da instabilidade registada deveria ter sido realizado em paralelo um controlo em embalagem de vidro completamente estanque.

O creme base desenvolvido demonstrou ser estável durante o período do estudo em que as voluntárias o aplicaram, uma vez que durante o estudo cada voluntária levou consigo dois lotes de creme base com o ativo incorporado, utilizando cada um durante o período de um mês. Um dos lotes foi dado às voluntárias no início do estudo e outro após um mês do início do mesmo. Assim, e apesar de se terem registado algumas alterações no estudo de estabilidade, em especial nas amostras armazenadas a 40°C, estas alterações não tiveram impacto no estudo de eficácia.

No que se refere à eficácia do produto teste, ou seja, o creme contendo 2% do péptido de sinalização Palmitoil-KMO₂K (Matrixyl® Synthe'6™) não foram observadas

grandes alterações na pele das voluntárias que participaram no estudo. O produto teste demonstrou ter melhorado alguns dos parâmetros relativos às propriedades mecânicas da pele, mas ao nível do relevo e das fibras de colagénio da derme não foram notadas alterações muito significativas ou mesmo significativas após a aplicação deste produto.

Com o equipamento Cutometer® é possível determinar a firmeza da pele, ou seja, a resistência que esta oferece à pressão negativa aplicada, bem como a sua elasticidade, isto é, a capacidade que tem para voltar à sua posição original. Deste modo, para avaliação do efeito do produto teste sobre as propriedades mecânicas da pele, foram estudados os parâmetros R0, que representa a deformação total da pele, ou seja, o comportamento passivo desta à aplicação de uma força (firmeza) (37) e os parâmetros de elasticidade R5 (índice de elasticidade) e R7 (índice de recuperação elástica). Estes dois últimos foram escolhidos por estarem descritos como sendo alguns dos parâmetros que representam a influência da idade sobre as propriedades mecânicas da pele e portanto, do envelhecimento cutâneo (38).

O parâmetro R0 é conhecido como a primeira amplitude máxima, U_f . Para este parâmetro contribui a parte elástica da pele, que reflete o alongamento das fibras elásticas e de colagénio (U_e), bem como a parte viscoelástica que está relacionada com o movimento do fluido intersticial na rede de fibras (U_v) durante a sucção (35). Neste estudo, houve uma diminuição muito significativa ($p < 0,01$) deste parâmetro após dois meses da aplicação do produto, indicando uma pele mais firme.

O parâmetro R5 representa o índice de elasticidade, ou seja, a razão entre a “recuperação elástica imediata” e a “distensão imediata” – U_r/U_e . Alguns autores (39) consideram mesmo este parâmetro o parâmetro de escolha para quantificar o envelhecimento da pele uma vez que representa a recuperação elástica, ou seja, a capacidade da pele em recuperar após uma deformação e, sabe-se que a recuperação imediata da pele diminui com a idade, traduzindo-se assim numa diminuição deste parâmetro. No presente estudo foi registado um aumento significativo ($p = 0,04$) deste parâmetro no final do estudo (dois meses), indicando uma pele mais elástica, uma vez que quanto mais próximo de um este parâmetro se encontrar mais elástica é a pele.

O parâmetro R7 representa o índice de recuperação elástica, ou seja, a razão entre “recuperação elástica imediata” e a “distensão final” – U_r/U_f (40). Este parâmetro tal como o anterior estão relacionados com as fibras elásticas e de colagénio, sendo que o R7 caracteriza melhor as propriedades elásticas da pele uma vez que inclui também a parte viscosa da deformação a pele (35). No presente estudo verificou-se que ao fim de dois meses da aplicação do produto teste houve um aumento quase significativo ($p = 0,069$) deste parâmetro, indicando uma maior elasticidade da pele.

Quanto ao relevo da pele, avaliado pelo equipamento PRIMOS™, não foram registadas alterações significativas na rugosidade da pele e profundidade das rugas ao fim de dois meses da utilização do produto teste. De todos os parâmetros obtidos com este equipamento apenas o volume verificou uma diminuição quase significativa tanto ao fim de um mês ($p = 0,072$) como ao fim de dois meses ($p = 0,090$).

Todavia no que se refere ao relevo da pele, os resultados obtidos neste estudo não corroboram os dados obtidos pela empresa Sederma, detentora da patente do ingrediente ativo Palmitoil-KMO₂K, num estudo realizado em 25 voluntárias com uma média de idades de 57 anos, o qual tinha o objetivo de avaliar, *in vivo*, o efeito de um creme contendo o ingrediente ativo Matrixyl® Synthe'6™ no relevo da pele da testa e da zona periocular designada de “pés de galinha”. Tal como no presente estudo as voluntárias aplicaram um creme contendo 2% de Matrixyl® Synthe'6™ duas vezes por dia, durante dois meses, com a diferença que este creme foi apenas aplicado num dos lados do rosto (previamente aleatorizado) e testa, enquanto no outro lado do rosto foi utilizado um creme placebo. Para avaliação do relevo da pele foi utilizada uma técnica com um princípio similar ao deste estudo: a técnica de FOITS (na designação anglo-saxónica *Fast Optical in vivo Topometry of Human Skin*).

No final do estudo, os resultados obtidos para o relevo da zona periocular demonstraram uma diminuição significativa do volume ocupado pelas rugas, com uma diferença média de -9,4% ($p < 0,05$) comparativamente ao tempo 0, enquanto no presente estudo essa diferença média foi de -5,4% ($p = 0,090$). Foi também avaliado um parâmetro denominado de “complexidade”, o qual é definido como a percentagem da superfície total criada com todos os relevos numa superfície perfeitamente plana. Este parâmetro reflete uma medida da rugosidade da pele, em que uma menor percentagem demonstra um efeito alisador. No estudo reportado a complexidade também diminuiu de forma significativa, cerca de -8,1% ($p = 0,05$) comparativamente ao tempo 0 (13, 41), ao contrário do presente estudo em que o parâmetro de rugosidade avaliado (Ra) registou uma diminuição de -3,87%, sem significado estatístico. Embora os parâmetros discutidos para ambas as técnicas, *Fast Optical in vivo Topometry of Human Skin* (FOITS) e *Phase Shift Rapid Imaging Of Skin* (PRIMOS), pretendam representar o mesmo tipo de informação não existe descrita na literatura qualquer tipo de correlação entre eles.

Mais parâmetros, relativos à zona periocular, como a superfície ocupada pelas rugas mais profundas (%), profundidade média da ruga mais profunda (μm) e ângulo de abertura da ruga, foram também avaliados no estudo da Sederma, no entanto com recurso às réplicas negativas (13). Tal como os parâmetros avaliados *in vivo* também estes demonstraram melhorias significativas após aplicação do creme contendo Matrixyl® Synthe'6™: a superfície ocupada pelas rugas mais profundas diminuiu -20% ($p < 0,01$)

comparativamente à superfície determinada no início do estudo; a profundidade média da ruga mais profunda diminuiu -11,2% ($p < 0,01$), uma maior percentagem comparativamente ao que se verificou no presente estudo em que a profundidade média das rugas apenas diminuiu -4,01%; também o ângulo de abertura da ruga demonstrou melhorias, tendo sofrido um aumento de +7% ($p < 0,01$) - quanto maior o ângulo de abertura da ruga, mais luz entra na ruga e diminui a perceção do tamanho desta. Todos estes parâmetros contra o placebo demonstraram também diferenças estatisticamente significativas.

O mecanismo de ação proposto para a molécula estudada está relacionado com o facto de esta representar uma sequência – KMK (Lysine-Methionine-Lysine) – encontrada nas proteínas da matriz extracelular: colagénio VI e lamininas e, como tal, apresentar grande similitude estrutural com as matriquinas (13). Atualmente sabe-se que a matriz extracelular não é apenas um suporte estrutural para as células do tecido conjuntivo, desempenhando também um papel importante na regulação da atividade celular. Proteínas da matriz extracelular são quebradas, por enzimas hidrolíticas específicas, em pequenos fragmentos sinalizadores que ativam várias vias de sinalização intracelular, resultando na modulação de diversas funções das células como adesão celular, migração, proliferação, síntese de proteínas ou apoptose; apresentando por exemplo atividade regeneradora durante a cicatrização de feridas (42, 43). Em 1999 Maquart (14) propôs a designação de “matriquinas” para estes péptidos que são libertados após proteólise parcial das macromoléculas da matriz extracelular e que são capazes de regular atividades celulares. Foi identificando esta semelhança estrutural e funcional entre as matriquinas e a sequência KMK que a Sederma decidiu investigar o potencial estimulador da síntese de colagénio em culturas de fibroblastos das moléculas Palmitoil-KMK e Palmitoil-KMO₂K com sucesso, verificando que este efeito é potenciado na molécula que apresenta a dioxigenação da metionina. Diversos estudos *in vitro* e *ex vivo* levados a cabo por esta empresa demonstraram que o péptido Palmitoil-KMO₂K, numa concentração de 4 e 5 ppm, o equivalente a 1,6 e 2% de Matrixyl® Synthe'6™, respetivamente, apresenta potencial de estimulação da síntese de vários componentes da matriz extracelular como o colagénio tipo I, III e IV, fibronectina, ácido hialurónico e laminina-5 bem como da proteína charperónica HSP70 (13).

Assim, com base no mecanismo de ação proposto para o péptido estudado seria de esperar que as principais alterações ocorressem ao nível da derme e que fosse possível avaliá-las com o microscópio confocal e de uma forma quantitativa com o *software* Confoscan, pois dos equipamentos utilizados é o que analisa a pele a um nível mais profundo.

Como já foi referido anteriormente a imagem obtida com a microscopia confocal de refletância baseia-se em variações naturais dos índices de refração das microestruturas do tecido para obter contraste. Na derme superficial é possível visualizar, com recurso à microscopia confocal, as fibras de colagénio, de forma não-invasiva, as quais se apresentam como estruturas fibrilares brilhantes, sem componentes celulares e sem núcleo visível (44) que podem apresentar forma distinta (Figura 31) de acordo com a idade. Indivíduos mais jovens apresentam fibras finas dispostas num padrão reticular, que diminuem de forma progressiva com a idade para dar lugar a fibras de colagénio de arranjo grosseiro e em amontoados (2).

O *software* utilizado para quantificar as alterações ocorridas na derme baseia-se na leitura de intensidades de brilho, ou seja, ele deteta as zonas da imagem que apresentam um brilho superior ao brilho definido como limiar de deteção, denominando essas zonas de “objetos”. Após processamento o *software* determina o perímetro e área desses objetos. Para além da área e do perímetro é possível obter um outro parâmetro, o Índice de Fragmentação A, que estabelece uma relação entre o número de objetos detetados numa imagem e a sua área. Este índice é tanto maior quanto maior o número de objetos presentes na imagem e menor a sua área. Como referido anteriormente as fibras dérmicas alteram-se com a idade perdendo a sua aparência de redes filamentosas e organizadas para se tornarem grosseiras e aglomeradas em amontoados que indicam fragmentação e degradação. Com a idade ocorre uma alteração da arquitetura da matriz dérmica (2) que pode ser avaliada na microscopia confocal através do Índice de Fragmentação A. Qualquer molécula que potencie a síntese de colagénio e/ou diminua a sua degradação deverá diminuir o Índice de Fragmentação A e aumentar o perímetro dos objetos analisados e consequentemente a área dos mesmos.

Os parâmetros quantitativos obtidos com o *software* Confoscan não apresentaram alterações significativas ao longo do estudo, indicando que a substância em estudo não provocou efeito ao nível da derme papilar. Contudo, a análise quantitativa efetuada com este *software* apresenta neste estudo algumas limitações:

- A análise das imagens da microscopia confocal não foi realizada por um perito em microscopia confocal. A análise deste tipo de imagens requer um programa de treino cuidadoso e prolongado (45). Para além de não terem sido analisadas por um perito também não foram analisadas por um investigador cego ao estudo como fizeram por exemplo Longo *et al* (2) e Kutlu Haytoglu *et al* (46) quando avaliaram os efeitos do envelhecimento cutâneo na pele de voluntários humanos com recurso à microscopia confocal.
- Não é possível distinguir as fibras de colagénio, por exemplo, das fibras elásticas ou mesmo dos fibroblastos, pois o *software* mede intensidade de

brilho numa área da imagem, quantificando tudo o que aparece com cor branca, ou seja, o que é refrativo.

- A área de pele analisada é muito pequena (0,5 x 0,5 mm) à qual se junta o facto de a área analisada ser no rosto onde existe uma grande densidade de unidades pilossebáceas (47), havendo mesmo alguns casos em que numa imagem eram visualizadas até 5 unidades pilossebáceas, impedindo assim uma quantificação correta das fibras de colagénio.

Do ponto de vista qualitativo, foi possível verificar, em algumas imagens, que houve uma alteração das fibras colagénio, como exemplificado na Figura 29, onde o colagénio antes do início do estudo é visualizado como uma massa amorfa e hiporrefletiva, não sendo possível visualizar fibras de colagénio individualizadas, para no final do estudo se observarem algumas fibras individualizadas com maior reflexão. Contudo, o efeito verificado neste estudo é muito menos acentuado que o verificado, por exemplo com a técnica de rejuvenescimento com *laser* de CO₂ fracionado, onde Longo *et al* (48) detetaram, através da microscopia confocal, uma forte remodelação do colagénio, visualizando fibras de colagénio longas e retas com muito brilho, com arranjo paralelo. Para além disso estes autores reportaram que esta forte remodelação de colagénio ocorreu em todos os casos, ao contrário do que foi verificado neste estudo em que este ligeiro efeito é apenas visível em algumas voluntárias.

Como referido anteriormente existem estudos *in vitro* e *ex vivo* que demonstram o efeito desta molécula por exemplo no aumento da síntese de colagénio tipo I. Num dos estudos os fibroblastos dérmicos humanos (FDH) foram cultivados na presença de 5 ppm de Palmitoil-KMO₂K (o que equivale a 2% de Matrixyl® Synthe'6™) e após análise de fotografias dos FDH corados (n = 3; 10 fotografias por produto) através da técnica de imunofluorescência foi demonstrado um aumento de +105% (p <0,01) da síntese de colagénio tipo I em comparação com o controlo. Num outro estudo realizado com explantes de pele de um indivíduo de 53 anos foi aplicado na superfície de um grupo de 5 explantes um creme contendo 2% de Matrixyl® Synthe'6™ e noutro grupo de 5 explantes um creme placebo, duas vezes por dia, durante 5 dias consecutivos. Os excertos de pele foram posteriormente congelados e cortados com um micróto e algumas proteínas como o colagénio tipo I foram avaliadas com recurso à imunofluorescência, cuja análise das imagens das secções dos explantes de pele (n = 5 secções; 50 fotos por produto) demonstrou que ocorreu um aumento da síntese de colagénio de +20% (p <0,01) comparativamente ao creme placebo.

A molécula Palmitoil-KMO₂K poderá de facto ter atividade *in vitro* e *ex vivo*, mas será que *in vivo* consegue penetrar ativamente na pele? O local de ação é a derme, mas

entre esta e o local de aplicação (estrato córneo) existem muitas barreiras físicas e químicas. Em primeiro lugar a molécula teria que atravessar o estrato córneo, o qual representa o principal obstáculo à permeação da pele. Depois teria que permear através da epiderme viável sem sofrer a ação das enzimas proteolíticas e uma vez chegada à derme teria de exercer o seu efeito antes de ser absorvido pela microvasculatura da derme. Acreditando que alcança a derme será que o faz numa concentração efetiva?

Apesar de o péptido KMO₂K possuir ligado ao grupo N-terminal da lisina um grupo lipofílico (ácido palmítico), para que a permeação ocorra é necessário que este composto (Figura 32) reúna uma série de propriedades físico-químicas ótimas, como (8, 49):

- Peso molecular menor que 500 Da;
- Coeficiente de partilha octanol/água ($\log P_{\text{(octanol/água)}}$) preferencialmente entre 1 e 3;
- Ponto de fusão menor 200°C;
- Solubilidade em água maior que 1 mg/ml;
- Nenhum ou poucos centros polares (preferencialmente menor que 5).

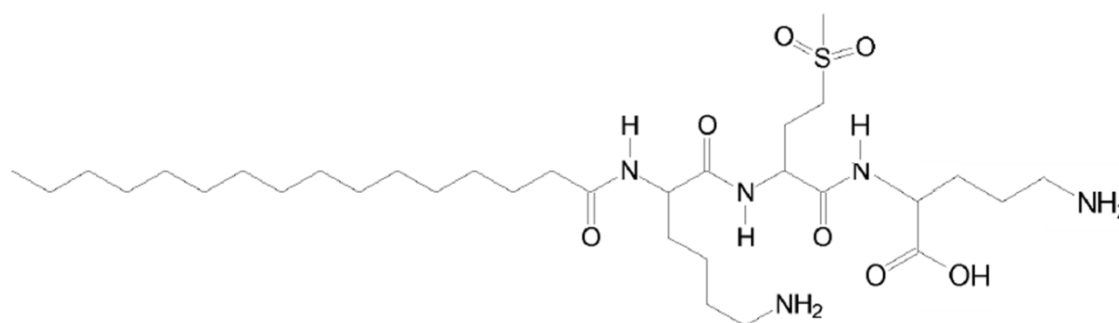


Figura 32 – Estrutura química do péptido Palmitoil-Lisil-Dioximethionol-Lisina (Palmitoi-KMO₂K).

Peso molecular = 675,97; $\log P_{\text{(octanol/água)}} = 4,01$ (50).

Do ponto de vista físico-químico e sem estudos de permeação publicados não existem evidências significativas de que esta molécula possa penetrar ativamente na pele e alcançar a derme numa concentração que lhe permita exercer o efeito demonstrado nos estudos *in vitro* e *ex vivo*.

No entanto, o creme utilizado no estudo foi capaz de provocar pequenas alterações estatisticamente significativas na pele das voluntárias, a maioria das quais apenas foi notada ao fim de dois meses de aplicação do produto teste, duas vezes por dia. Houve uma tendência para melhoria dos parâmetros estudados ao longo do estudo, podendo eventualmente indicar que caso o estudo tivesse sido prolongado ou tivesse sido utilizada uma concentração maior do ingrediente ativo mais alterações estatisticamente significativas tivessem sido registadas. Uma explicação para esta tendência pode residir

no facto de o ingrediente ativo em estudo exercer o seu efeito na derme não por uma penetração significativa através da pele, uma vez que se trata de uma molécula de elevado peso molecular com propriedades físico-químicas pouco favoráveis à permeação pela via intercelular, mas sim pela formação de um reservatório na pele resultado de aplicações repetidas. De facto esta foi a possibilidade apontada pelos autores Abu Samah e Heard (51) para justificar os resultados clínicos benéficos apresentados em alguns estudos *in vivo* (52, 53) realizados com o péptido palmitoil-KTTKS (lisina-treonina-treonina-lisina-serina), após terem feito uma revisão de todos os dados existentes sobre a permeação deste péptido e do péptido KTTKS através da pele e não terem encontrado dados que demonstrassem que os mesmos penetram a pele de forma significativa. Uma outra observação que pode fortalecer a teoria da formação de um reservatório na pele resultado de aplicações repetidas e que permita explicar que não tenham sido registadas grandes alterações no relevo da pele nem na síntese de colagénio pode estar relacionada com o facto de estas medições terem sido realizadas numa área de pele muito próxima do olho, comparativamente à avaliação das propriedades mecânicas da pele, que se realizou ao longo da maçã do rosto. Assim, pode ter acontecido que o creme não tenha sido aplicado pelas voluntárias nas zonas mais próximas do olho na mesma proporção em que foi aplicado no resto do rosto, no sentido de evitar o contacto da mucosa ocular com o creme. Também no estudo reportado pela Sederma (estudo descrito acima) foram registadas menores percentagens de redução do volume na zona periocular do que na zona da testa (13). No entanto, tratam-se apenas de especulações uma vez que a formação de um reservatório não é um processo fácil pois a pele secreta constantemente lípidos e suor para o seu exterior e as próprias células da epiderme vão migrando em direção à sua superfície desde a camada basal até ao estrato córneo onde vão sendo diariamente destacadas (54).

Os equipamentos utilizados permitiram avaliar a pele a diferentes níveis. O Cutometer® utilizando uma sonda de pequeno diâmetro (2 mm), é adequado para medir as propriedades mecânicas da epiderme e derme papilar (35, 40) e, o equipamento PRIMOS™ permite analisar a pele a um nível mais superficial. Já o microscópio confocal VivaScope® 1500 por outro lado permite a análise e observação da pele a um nível mais profundo.

Não foram encontradas correlações entre os parâmetros obtidos com os diferentes equipamentos antes do início do estudo, indicando que cada equipamento é capaz de nos oferecer diferentes tipos de informação, até porque como referido anteriormente são equipamentos que analisam a pele a diferentes níveis.

Por outro lado, se analisarmos as correlações existentes entre as diferenças dos vários parâmetros, após dois meses da aplicação do produto teste e o início do estudo, verifica-se que as correlações já observadas inicialmente se tornam mais fortes e que são notadas novas correlações entre alguns dos parâmetros obtidos com o equipamento Cutometer® e alguns dos parâmetros adquiridos com o microscópio confocal, após processamento com o *software* Confoscan. Não se sabe exatamente quais as alterações ao nível da pele que permitiram evidenciar estas correlações, no entanto, estas são de certa forma esperadas uma vez que dos três equipamentos utilizados, o Cutometer® e o microscópio confocal VivaScope® 1500 oferecem cada um de forma diferente dados que permitem avaliar alterações ocorridas na derme.

2.4 Conclusão

Nos últimos anos, a indústria cosmética tem investido muito no desenvolvimento de novas moléculas e numerosos produtos cosméticos com o propósito de atrasar e/ou reverter o envelhecimento cutâneo.

No âmbito da presente dissertação foi utilizado um ingrediente ativo da categoria dos péptidos, moléculas recentes e populares no tratamento do envelhecimento cutâneo. Contudo, apesar de toda a popularidade e potencial em exercer uma ação ao nível da derme, onde correm as principais alterações cutâneas relacionadas com o envelhecimento, são também evidentes as suas características intrínsecas pouco favoráveis à permeação cutânea.

Após avaliação da eficácia do produto teste, ou seja, o creme contendo 2% do péptido de sinalização Palmitoil-KMO₂K (Matrixyl® Synthe'6™) não foram observadas grandes alterações na pele das voluntárias que participaram no estudo. O produto teste demonstrou ter melhorado alguns dos parâmetros relativos às propriedades mecânicas da pele, mas ao nível do relevo e das fibras de colagénio da derme não foram notadas alterações significativas após a aplicação deste produto. Estes resultados levam ao aparecimento de algumas questões, tais como:

- Será que este péptido consegue penetrar ativamente na pele e alcançar a derme?
- Considerando que após aplicação na superfície da pele atinge o seu local de ação será que o faz numa concentração efetiva? Há evidências de que este péptido tenha efeito *in vitro* em concentrações de 4 e 5 ppm, o equivalente a 1,6 e 2% de Matrixyl® Synthe'6™, respetivamente, mas qual a concentração que atinge a derme?
- Qual a concentração mínima em que este deve ser aplicado na superfície da pele? E qual o número mínimo de aplicações para que ocorram efeitos mensuráveis?
- Em caso de permeação qual a via preferencial?
- Terá de facto uma atividade *in vivo*?

Com base nos resultados apresentados neste estudo e com o intuito de esclarecer as questões levantadas fica a necessidade de se realizarem futuros estudos de permeação *in vitro* desta molécula, por si só ou, com recurso a promotores de absorção físicos como a iontoforese, a sonoforese, a eletroporação e os sistemas de microagulhas (45, 55-57). A realização de mais estudos de eficácia *in vivo*, utilizando esta e outras moléculas semelhantes, poderá também ser útil para esclarecer qual o real papel deste tipo de compostos na área cosmética.

Quanto aos equipamentos utilizados para realizar a avaliação de eficácia foi demonstrado a mais-valia da microscopia confocal de refletância, que tornou possível de forma não-invasiva e repetida visualizar a pele em profundidade e, obter informações mensuráveis, apesar de algumas limitações. Trata-se assim de uma técnica bem tolerada *in vivo* que nos permite visualizar a pele em profundidade obtendo dados que com recurso às técnicas de biometria “clássicas” não seriam possíveis de obter. Apesar de todo o potencial que foi demonstrado para a microscopia confocal as técnicas de biometria “clássicas” não são de forma alguma dispensáveis na avaliação dos efeitos de produtos cosméticos, uma vez que analisam a pele a um outro nível e nos permitem obter diferentes parâmetros.

Em conclusão, foi demonstrado neste estudo que é possível avaliar a eficácia de produtos cosméticos ao longo do tempo, não só ao nível da superfície da pele mas também ao nível das camadas inferiores, oferecendo assim a possibilidade da sua visualização, sem recurso a métodos invasivos. As técnicas biométricas utilizadas neste trabalho demonstraram ser bem toleradas *in vivo*, oferecendo diferentes tipos de informação.

3 Referências bibliográficas

1. Barel AO, Paye M, Maibach HI. Handbook of Cosmetic Science and Technology. Third ed: Marcel Dekker Incorporated; 2001.
2. Longo C, Casari A, Beretti F, Cesinaro AM, Pellacani G. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. J Am Acad Dermatol. 2011.
3. Gilchrest BA, Krutmann J. Skin Aging: Springer; 2006.
4. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. Int J Cosmet Sci. 2008;30(2):87-95.
5. Rona C, Vailati F, Berardesca E. The cosmetic treatment of wrinkles. J Cosmet Dermatol. 2004;3(1):26-34.
6. Fernandes D. Evolution of Cosmeceuticals and Their Application to Skin Disorders, Including Aging and Blemishes. Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development. p. 45-60.
7. Lupo MP. Cosmeceutical Peptides. Dermatol Surg. 2005;31:832-6.
8. Gorouhi F, Maibach HI. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. Int J Cosmet Sci. 2009;31(5):327-45.
9. Pentapharm. Syn®-Coll. [17-10-2013]; Available from: http://www.ingredientstodiefor.com/files/DATA_Syn-Coll.pdf.
10. Fragiadaki M, Ikeda T, Witherden A, Mason RM, Abraham D, Bou-Gharios G. High doses of TGF- β potently suppress type I collagen via the transcription factor CUX1. Mol Biol Cell. 2011;22(11):1836-44.
11. Bentley J HTKWJB, et al. Peptides from live yeast cell derivative stimulate wound healing. Arch Surg. 1990;125(5):641-6.
12. Canapp SO, Farese JP, Schultz GS, Gowda S, Ishak AM, Swaim SF, et al. The effect of topical tripeptide-copper complex on healing of ischemic open wounds. Vet Surg. 2003;32(6):515-23.
13. Sederma. MATRIXYL® synthé'6™ - Wrinkle filling by stimulation of the synthesis of 6 major structural components of the skin. 2010.
14. Maquart F, Simeon A, Pasco S, Monboisse J. Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracelulaire : le concept de matrikines. J Soc Biol. 1999;193(4):423.
15. Fournial A, Mondon P, Peschard O, inventors; New compounds, in particular peptides, compositions comprising them and cosmetic and dermopharmaceutical uses. patent WO/2010/082175. 2010.
16. Rodrigues L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: Indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. Rev Port Farm. 1995;XLV(1):16-23.
17. Ferreira MO. Efeitos cutâneos da água termal de S.Pedro do Sul. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2008.

18. Rawlings AV, Matts PJ, Anderson CD, Roberts MS. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2008;5(2):e127-e36.
19. Rodrigues L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: princípios e metodologias. *Rev Port Farm.* 1995;XLV (2):48-59.
20. Serup J, Jemec GBE, Grove GL. *Handbook of Non-Invasive Methods And The Skin*: CRC/Taylor & Francis; 2006.
21. Courage-Khazaka. Cutometer® dual MPA 580 [01-12-12]; Available from: <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/140-cutometer>.
22. Neto P, Ferreira M, Bahia F, Costa P. Improvement of the methods for skin mechanical properties evaluation through correlation between different techniques and factor analysis. *Skin Res Technol.* 2013;19(4):405-16.
23. Lévêque JL. EEMCO guidance for the assessment of skin topography. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1999;12:103-14.
24. GFM. GFM - The Technology. [02-12-12]; Available from: http://www.gfm3d.com/index.php?option=com_content&view=article&id=151&Itemid=98&lang=en.
25. Pschorn S. Non-contact 3D measuring technology for medical and cosmetic applications. Intelligent camera permits fast and highly precise image processing. 2013 [30-08-2014]; Available from: http://www.qmtmag.com/display_edc.cfm?edno=88821.
26. GFM. Tutorial for the calculation of roughness. 2008.
27. Nehal KS, Gareau D, Rajadhyaksha M. Skin imaging with reflectance confocal microscopy. *Semin Cutan Med Surg.* 2008;27(1):37-43.
28. Minsky M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. 1988 [12-08-12]; Available from: <http://web.media.mit.edu/~minsky/papers/ConfocalMemoir.html>.
29. Semwogerere D, Weeks ER. Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*: Taylor & Francis; 2005.
30. Paddock SW, Fellers TJ, Davidson MW. Confocal Microscopy - Basic Concepts. Nikon; [13-08-12]; Available from: <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>.
31. Wihelm K, Elsner P, Berardesca E, Maibach HI. *Bioengineering of the Skin: Skin Surface Imaging and Analysis*. USA: CRC Press; 1997.
32. Wilhelm S. Confocal Laser Scanning Microscopy. Zeiss; 2010 [04-09-12]; Available from: [http://www.zeiss.de/C1256D18002CC306/0/F99A7F3E8944EEE3C1256E5C0045F68B/\\$file/60-1-0030_confocal-principles.pdf](http://www.zeiss.de/C1256D18002CC306/0/F99A7F3E8944EEE3C1256E5C0045F68B/$file/60-1-0030_confocal-principles.pdf).

33. Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol.* 1999;113(3):293-303.
34. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol.* 1995;104(6):946-52.
35. Dobrev HP. A study of human skin mechanical properties by means of Cutometer. *Folia medica.* 2002;44(3):5-10.
36. D'Hainaut L. *Conceitos e Métodos da Estatística.* 2ª ed. 1 vol. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1997.
37. Courage-Khazaka. Scientific Devices - Cutometer® dual MPA 580. [21/08/2014]; Available from: <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/140-cutometer>.
38. Krueger N, Luebberding S, Oltmer M, Streker M, Kerscher M. Age-related changes in skin mechanical properties: a quantitative evaluation of 120 female subjects. *Skin Res Technol.* 2011;17(2):141-8.
39. Koch R, Cheng ET. Quantification of skin elasticity changes associated with pulsed carbon dioxide laser skin resurfacing. *Arch Facial Plast Surg.* 1999;1(4):272-5.
40. Dobrev H. Use of Cutometer to assess epidermal hydration. *Skin Res Technol.* 2000;6(4):239-44.
41. Nada A, Doridot E, Peschard O, Criton P, Gracioso O, Mondon P. Dermis redensification via collagen synthesis. *Personal Care.* 2011:34-6.
42. Maquart F-X, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse J-C. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity: Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;49(3):199-202.
43. Mas-Chamberlin C, Mondon P, Peschard O, Lintner K. Matrikine technology and barrier repair: the Ultimate in anti-age skin care? *Cosmetic Science Technology.* 2004.
44. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvehy J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(4):644-58.
45. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Fessi H, Guy RH. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):301-16.
46. Kutlu Haytoglu NS, Gurel MS, Erdemir A, Falay T, Dolgun A, Haytoglu TG. Assessment of skin photoaging with reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol.* 2014;20(3):363-72.

47. Lieb J, Gill M, Patel Y. Reflectance confocal microscopy of cutaneous tumors (an atlas with clinical, dermoscopic and histological correlations). London, UK: Informa Healthcare; 2008.
48. Longo C, Galimberti M, De Pace B, Pellacani G, Bencini P. Laser skin rejuvenation: epidermal changes and collagen remodeling evaluated by in vivo confocal microscopy. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):769-76.
49. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev.* 1997;23(1–3):3-25.
50. CIR. Safety Assessment of Palmitoyl Oligopeptides Ingredients as Used in Cosmetics. 2013.
51. Abu Samah NH, Heard CM. Topically applied KTTKS: a review. *Int J Cosmet Sci.* 2011;33(6):483-90.
52. Robinson LR, Fitzgerald NC, Doughty DG, Dawes NC, Berge CA, Bissett DL. Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin. *Int J Cosmet Sci.* 2005;27(3):155-60.
53. Osborne R, Robinson L, Mullins L, Raleigh P, Li J, Miyamoto K. Use of a Facial Moisturizer Containing Pal-KTTKS Peptide. 63rd American Academy of Dermatology Annual Meeting, New Orleans. 2005.
54. Jackson SM, Williams ML, Feingold KR, Elias PM. Pathobiology of the stratum corneum. *West J Med.* 1993;158(3):279–85.
55. Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(2):115-24.
56. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Tech Today.* 2000;3(9):318-26.
57. Badran MM, Kuntsche J, Fahr A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. *Eur J Pharm Sci.* 2009;36(4–5):511-23.

4 Anexos

ANEXO I – Questionário de Recrutamento

ANEXO II – Instruções dadas às voluntárias

ANEXO III – Consentimento Informado

ANEXO IV – Ficha de registo de medições: Cutometer® e PRIMOS™

ANEXO V – Ficha de registo de medições: Microscópio confocal

ANEXO VI – Estatística descritiva e testes de normalidade

Tabela 23 - Estatística descritiva para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada à temperatura ambiente.

| | | Estatística | Erro Padrão |
|----------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| pH_Dif_T1_T0_TempAmb | Média | -,0987 | ,02872 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior Limite superior | -,2222 ,0249 |
| | 5% da média aparada | . | . |
| | Mediana | -,0730 | . |
| | Variância | ,002 | . |
| | Desvio Padrão | ,04974 | . |
| | Mínimo | -,16 | . |
| | Máximo | -,07 | . |
| | Intervalo | ,09 | . |
| | Intervalo interquartil | . | . |
| | Assimetria | -1,704 | 1,225 |
| | Curtose | . | . |
| pH_Dif_T2_T0_TempAmb | Média | -,0127 | ,05085 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior Limite superior | -,2314 ,2061 |
| | 5% da média aparada | . | . |
| | Mediana | -,0450 | . |
| | Variância | ,008 | . |
| | Desvio Padrão | ,08807 | . |
| | Mínimo | -,08 | . |
| | Máximo | ,09 | . |
| | Intervalo | ,17 | . |
| | Intervalo interquartil | . | . |
| | Assimetria | 1,429 | 1,225 |
| | Curtose | . | . |

Tabela 24 - Testes de normalidade para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada à temperatura ambiente.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| pH_Dif_T1_T0_TempAmb | ,364 | 3 | . | ,800 | 3 | ,115 |
| pH_Dif_T2_T0_TempAmb | ,310 | 3 | . | ,899 | 3 | ,382 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 25 - Estatística descritiva para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada a 40°C.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| pH 40C Dif (T1-T0) | Média | | -,4647 | ,02730 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -,5821 | |
| | | Limite superior | -,3472 | |
| | 5% da média aparada | | . | |
| | Mediana | | -,4520 | |
| | Variância | | ,002 | |
| | Desvio Padrão | | ,04729 | |
| | Mínimo | | -,52 | |
| | Máximo | | -,43 | |
| | Intervalo | | ,09 | |
| | Intervalo interquartil | | . | |
| | Assimetria | | -1,119 | 1,225 |
| | Curtose | | . | . |
| pH 40C Dif (T2-T0) | Média | | -5,4823 | ,04680 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -5,6837 | |
| | | Limite superior | -5,2810 | |
| | 5% da média aparada | | . | |
| | Mediana | | -5,5230 | |
| | Variância | | ,007 | |
| | Desvio Padrão | | ,08105 | |
| | Mínimo | | -5,54 | |
| | Máximo | | -5,39 | |
| | Intervalo | | ,15 | |
| | Intervalo interquartil | | . | |
| | Assimetria | | 1,689 | 1,225 |
| | Curtose | | . | . |

Tabela 26 - Testes de normalidade para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada a 40°C.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| pH 40C Dif (T1-T0) | ,272 | 3 | . | ,946 | 3 | ,553 |
| pH 40C Dif (T2-T0) | ,359 | 3 | . | ,811 | 3 | ,142 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 27 - Estatística descritiva para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s⁻¹ da amostra armazenada à temperatura ambiente.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Viscosidade_T0 | Média | | 43,2200 | ,64086 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 40,4626 | |
| | | Limite superior | 45,9774 | |
| | 5% da média aparada | | . | |
| | Mediana | | 43,2200 | |
| | Variância | | 1,232 | |
| | Desvio Padrão | | 1,11000 | |
| | Mínimo | | 42,11 | |
| | Máximo | | 44,33 | |
| | Intervalo | | 2,22 | |
| | Intervalo interquartil | | . | |
| | Assimetria | | ,000 | 1,225 |
| | Curtose | | . | . |
| Viscosidade_T1M_TempAm b | Média | | 53,5600 | ,74000 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 50,3760 | |
| | | Limite superior | 56,7440 | |
| | 5% da média aparada | | . | |
| | Mediana | | 52,8200 | |
| | Variância | | 1,643 | |
| | Desvio Padrão | | 1,28172 | |
| | Mínimo | | 52,82 | |
| | Máximo | | 55,04 | |
| | Intervalo | | 2,22 | |
| | Intervalo interquartil | | . | |
| | Assimetria | | 1,732 | 1,225 |
| | Curtose | | . | . |
| Viscosidade_T2M_TempAm b | Média | | 55,7800 | ,37000 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 54,1880 | |
| | | Limite superior | 57,3720 | |
| | 5% da média aparada | | . | |
| | Mediana | | 55,4100 | |
| | Variância | | ,411 | |
| | Desvio Padrão | | ,64086 | |
| | Mínimo | | 55,41 | |
| | Máximo | | 56,52 | |
| | Intervalo | | 1,11 | |

| | | |
|------------------------|-------|-------|
| Intervalo interquartil | . | . |
| Assimetria | 1,732 | 1,225 |
| Curtose | . | . |

Tabela 28 – Testes de normalidade para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s⁻¹ da amostra armazenada à temperatura ambiente.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| Viscosidade_T0 | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| Viscosidade_T1M_TempAm b | ,385 | 3 | . | ,750 | 3 | ,000 |
| Viscosidade_T2M_TempAm b | ,385 | 3 | . | ,750 | 3 | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 29 - Estatística descritiva para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s⁻¹ da amostra armazenada a 40°C.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Viscosidade_T0 | Média | | 43,2200 | ,64086 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 40,4626 | |
| | | Limite superior | 45,9774 | |
| | 5% da média aparada | | . | |
| | Mediana | | 43,2200 | |
| | Variância | | 1,232 | |
| | Desvio Padrão | | 1,11000 | |
| | Mínimo | | 42,11 | |
| | Máximo | | 44,33 | |
| | Intervalo | | 2,22 | |
| | Intervalo interquartil | | . | |
| | Assimetria | | ,000 | 1,225 |
| | Curtose | | . | . |
| Viscosidade_T1M_40°C | Média | | 98,6367 | 25,69255 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -11,9094 | |
| | | Limite superior | 209,1828 | |
| | 5% da média aparada | | . | |
| | Mediana | | 74,2500 | |
| | Variância | | 1980,321 | |
| | Desvio Padrão | | 44,50080 | |
| | Mínimo | | 71,66 | |
| | Máximo | | 150,00 | |

| | | | |
|----------------------|---------------------------------------|---|----------|
| | Intervalo | 78,34 | |
| | Intervalo interquartil | . | |
| | Assimetria | 1,725 | 1,225 |
| | Curtose | . | . |
| Viscosidade_T2M_40°C | Média | 165,3667 | 18,68978 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior 84,9510 Limite superior 245,7823 | |
| | 5% da média aparada | . | |
| | Mediana | 164,0000 | |
| | Variância | 1047,923 | |
| | Desvio Padrão | 32,37164 | |
| | Mínimo | 133,70 | |
| | Máximo | 198,40 | |
| | Intervalo | 64,70 | |
| | Intervalo interquartil | . | |
| | Assimetria | ,190 | 1,225 |
| | Curtose | . | . |

Tabela 30 - Testes de normalidade para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte $5,027 \text{ s}^{-1}$ da amostra armazenada a 40°C .

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| Viscosidade_T0 | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| Viscosidade_T1M_40°C | ,375 | 3 | . | ,775 | 3 | ,056 |
| Viscosidade_T2M_40°C | ,184 | 3 | . | ,999 | 3 | ,930 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 31 – Estatística descritiva para as diferenças do parâmetro R0.

| | Estatística | Erro Padrão |
|----------------|---------------------------------------|---|
| R0 Dif (T1-T0) | Média | -,0005 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior -,0167 Limite superior ,0156 |
| | 5% da média aparada | -,0006 |
| | Mediana | -,0020 |
| | Variância | ,002 |
| | Desvio Padrão | ,03991 |
| | Mínimo | -,07 |
| | Máximo | ,07 |
| | Intervalo | ,14 |

| | | | | |
|----------------|---------------------------------------|-----------------|--------|--------|
| R0 Dif (T2-T0) | Intervalo interquartil | | ,07 | |
| | Assimetria | | ,131 | ,456 |
| | Curtose | | -1,002 | ,887 |
| | Média | | -,0330 | ,00536 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -,0440 | |
| | | Limite superior | -,0219 | |
| | 5% da média aparada | | -,0323 | |
| | Mediana | | -,0325 | |
| | Variância | | ,001 | |
| | Desvio Padrão | | ,02735 | |
| | Mínimo | | -,09 | |
| | Máximo | | ,01 | |
| | Intervalo | | ,10 | |
| | Intervalo interquartil | | ,05 | |
| | Assimetria | | -,288 | ,456 |
| | Curtose | | -,862 | ,887 |

Tabela 32 – Testes de normalidade para as diferenças do parâmetro R0.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------|---------------------------------|----|-------------------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| R0 Dif (T1-T0) | ,131 | 26 | ,200 [*] | ,959 | 26 | ,381 |
| R0 Dif (T2-T0) | ,156 | 26 | ,105 | ,949 | 26 | ,225 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors.

Tabela 33 – Estatística descritiva para o parâmetro R5.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|-------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| R5_T0 | Média | | ,4653 | ,01302 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | ,4385 | |
| | | Limite superior | ,4921 | |
| | 5% da média aparada | | ,4666 | |
| | Mediana | | ,4615 | |
| | Variância | | ,004 | |
| | Desvio Padrão | | ,06639 | |
| | Mínimo | | ,28 | |
| | Máximo | | ,61 | |
| | Intervalo | | ,33 | |
| | Intervalo interquartil | | ,07 | |

| | | | | |
|-------|---------------------------------------|-----------------|--------|--------|
| | Assimetria | | -,224 | ,456 |
| | Curtose | | 1,479 | ,887 |
| R5_T1 | Média | | ,5157 | ,02810 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | ,4579 | |
| | | Limite superior | ,5736 | |
| | 5% da média aparada | | ,5025 | |
| | Mediana | | ,4820 | |
| | Variância | | ,021 | |
| | Desvio Padrão | | ,14326 | |
| | Mínimo | | ,36 | |
| | Máximo | | ,91 | |
| | Intervalo | | ,55 | |
| | Intervalo interquartil | | ,14 | |
| | Assimetria | | 1,662 | ,456 |
| | Curtose | | 2,567 | ,887 |
| R5_T2 | Média | | ,5738 | ,02968 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | ,5127 | |
| | | Limite superior | ,6349 | |
| | 5% da média aparada | | ,5745 | |
| | Mediana | | ,5575 | |
| | Variância | | ,023 | |
| | Desvio Padrão | | ,15133 | |
| | Mínimo | | ,30 | |
| | Máximo | | ,84 | |
| | Intervalo | | ,54 | |
| | Intervalo interquartil | | ,23 | |
| | Assimetria | | -,035 | ,456 |
| | Curtose | | -,842 | ,887 |

Tabela 34 – Testes de normalidade para os resultados do parâmetro R5.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| R5_T0 | ,105 | 26 | ,200* | ,966 | 26 | ,512 |
| R5_T1 | ,219 | 26 | ,002 | ,817 | 26 | ,000 |
| R5_T2 | ,079 | 26 | ,200* | ,971 | 26 | ,639 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 35 - Estatística descritiva para as diferenças do parâmetro R7.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|----------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| R7 Dif (T1-T0) | Média | | ,0065 | ,00793 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -,0098 | |
| | | Limite superior | ,0228 | |
| | 5% da média aparada | | ,0052 | |
| | Mediana | | ,0045 | |
| | Variância | | ,002 | |
| | Desvio Padrão | | ,04042 | |
| | Mínimo | | -,07 | |
| | Máximo | | ,12 | |
| | Intervalo | | ,19 | |
| | Intervalo interquartil | | ,05 | |
| | Assimetria | | ,454 | ,456 |
| | Curtose | | 1,655 | ,887 |
| R7 Dif (T2-T0) | Média | | ,0198 | ,01041 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -,0016 | |
| | | Limite superior | ,0412 | |
| | 5% da média aparada | | ,0194 | |
| | Mediana | | ,0110 | |
| | Variância | | ,003 | |
| | Desvio Padrão | | ,05307 | |
| | Mínimo | | -,07 | |
| | Máximo | | ,13 | |
| | Intervalo | | ,20 | |
| | Intervalo interquartil | | ,08 | |
| | Assimetria | | ,091 | ,456 |
| | Curtose | | -,539 | ,887 |

Tabela 36 - Testes de normalidade para as diferenças do parâmetro R7.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------|---------------------------------|----|-------------------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| R7 Dif (T1-T0) | ,128 | 26 | ,200 [*] | ,959 | 26 | ,376 |
| R7 Dif (T2-T0) | ,104 | 26 | ,200 [*] | ,973 | 26 | ,700 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 37 - Estatística descritiva para os valores do volume das cavidades.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|-----------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Volume_T0 | Média | | 2,1669 | ,14939 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 1,8593 | |
| | | Limite superior | 2,4746 | |
| | 5% da média aparada | | 2,1152 | |
| | Mediana | | 2,1100 | |
| | Variância | | ,580 | |
| | Desvio Padrão | | ,76172 | |
| | Mínimo | | ,94 | |
| | Máximo | | 4,44 | |
| | Intervalo | | 3,50 | |
| | Intervalo interquartil | | ,82 | |
| | Assimetria | | 1,164 | ,456 |
| | Curtose | | 2,184 | ,887 |
| Volume_T1 | Média | | 2,0250 | ,11573 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 1,7867 | |
| | | Limite superior | 2,2633 | |
| | 5% da média aparada | | 2,0061 | |
| | Mediana | | 1,8950 | |
| | Variância | | ,348 | |
| | Desvio Padrão | | ,59009 | |
| | Mínimo | | ,97 | |
| | Máximo | | 3,54 | |
| | Intervalo | | 2,57 | |
| | Intervalo interquartil | | ,73 | |
| | Assimetria | | ,494 | ,456 |
| | Curtose | | ,400 | ,887 |
| Volume_T2 | Média | | 2,0131 | ,13491 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 1,7352 | |
| | | Limite superior | 2,2909 | |
| | 5% da média aparada | | 1,9659 | |
| | Mediana | | 1,9200 | |
| | Variância | | ,473 | |
| | Desvio Padrão | | ,68791 | |
| | Mínimo | | ,94 | |
| | Máximo | | 4,18 | |
| | Intervalo | | 3,24 | |
| | Intervalo interquartil | | 1,06 | |

| | | |
|------------|-------|------|
| Assimetria | 1,131 | ,456 |
| Curtose | 2,481 | ,887 |

Tabela 38 – Testes de normalidade para os resultados do volume das cavidades.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------|---------------------------------|----|-------------------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| Volume_T0 | ,144 | 26 | ,172 | ,928 | 26 | ,068 |
| Volume_T1 | ,110 | 26 | ,200 [*] | ,973 | 26 | ,710 |
| Volume_T2 | ,105 | 26 | ,200 [*] | ,922 | 26 | ,051 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 39 - Estatística descritiva para as diferenças da rugosidade aritmética (Ra).

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|----------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Ra Dif (T1-T0) | Média | | -1,3782 | ,70309 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -2,8262 | |
| | | Limite superior | ,0698 | |
| | 5% da média aparada | | -1,2021 | |
| | Mediana | | -1,6500 | |
| | Variância | | 12,853 | |
| | Desvio Padrão | | 3,58505 | |
| | Mínimo | | -10,99 | |
| | Máximo | | 4,32 | |
| | Intervalo | | 15,31 | |
| | Intervalo interquartil | | 4,14 | |
| | Assimetria | | -,467 | ,456 |
| | Curtose | | ,994 | ,887 |
| Ra Dif (T2-T0) | Média | | -1,1962 | ,80943 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -2,8633 | |
| | | Limite superior | ,4709 | |
| | 5% da média aparada | | -1,0544 | |
| | Mediana | | -1,2685 | |
| | Variância | | 17,035 | |
| | Desvio Padrão | | 4,12731 | |
| | Mínimo | | -12,88 | |
| | Máximo | | 7,11 | |
| | Intervalo | | 19,99 | |
| | Intervalo interquartil | | 3,82 | |
| | Assimetria | | -,534 | ,456 |

| | | |
|---------|-------|------|
| Curtose | 1,668 | ,887 |
|---------|-------|------|

Tabela 40 - Testes de normalidade para as diferenças da rugosidade aritmética (Ra).

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------|---------------------------------|----|-------------------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| Ra Dif (T1-T0) | ,109 | 26 | ,200 [*] | ,943 | 26 | ,162 |
| Ra Dif (T2-T0) | ,127 | 26 | ,200 [*] | ,957 | 26 | ,330 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 41 - Estatística descritiva para os valores da profundidade das rugas.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|-----------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Profundidade_T0 | Média | | 133,3846 | 9,28259 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 114,2668 | |
| | | Limite superior | 152,5025 | |
| | 5% da média aparada | | 130,7949 | |
| | Mediana | | 124,0000 | |
| | Variância | | 2240,326 | |
| | Desvio Padrão | | 47,33208 | |
| | Mínimo | | 69,00 | |
| | Máximo | | 252,00 | |
| | Intervalo | | 183,00 | |
| | Intervalo interquartil | | 57,75 | |
| | Assimetria | | ,746 | ,456 |
| | Curtose | | ,174 | ,887 |
| Profundidade_T1 | Média | | 125,9231 | 7,73084 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 110,0011 | |
| | | Limite superior | 141,8450 | |
| | 5% da média aparada | | 125,4786 | |
| | Mediana | | 125,0000 | |
| | Variância | | 1553,914 | |
| | Desvio Padrão | | 39,41971 | |
| | Mínimo | | 61,00 | |
| | Máximo | | 197,00 | |
| | Intervalo | | 136,00 | |
| | Intervalo interquartil | | 68,00 | |
| | Assimetria | | ,093 | ,456 |
| | Curtose | | -1,200 | ,887 |
| Profundidade_T2 | Média | | 124,9615 | 7,57150 |

| | | | |
|---------------------------------------|-----------------|----------|------|
| 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | 109,3677 | |
| | Limite superior | 140,5553 | |
| 5% da média aparada | | 124,2991 | |
| Mediana | | 119,5000 | |
| Variância | | 1490,518 | |
| Desvio Padrão | | 38,60723 | |
| Mínimo | | 66,00 | |
| Máximo | | 194,00 | |
| Intervalo | | 128,00 | |
| Intervalo interquartil | | 59,00 | |
| Assimetria | | ,358 | ,456 |
| Curtose | | -,683 | ,887 |

Tabela 42 - Testes de normalidade para os resultados da profundidade das rugas.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------------|---------------------------------|----|-------------------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| Profundidade_T0 | ,123 | 26 | ,200 [*] | ,946 | 26 | ,189 |
| Profundidade_T1 | ,122 | 26 | ,200 [*] | ,948 | 26 | ,208 |
| Profundidade_T2 | ,113 | 26 | ,200 [*] | ,940 | 26 | ,132 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 43 - Estatística descritiva para as diferenças do perímetro dos “objetos” analisados.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Perímetro Dif (T1-T0) | Média | | ,0139 | ,54499 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -1,1085 | |
| | | Limite superior | 1,1363 | |
| | 5% da média aparada | | ,0711 | |
| | Mediana | | ,0690 | |
| | Variância | | 7,722 | |
| | Desvio Padrão | | 2,77892 | |
| | Mínimo | | -5,91 | |
| | Máximo | | 5,15 | |
| | Intervalo | | 11,06 | |
| | Intervalo interquartil | | 3,62 | |
| | Assimetria | | -,348 | ,456 |
| | Curtose | | -,077 | ,887 |
| Perímetro Dif (T2-T0) | Média | | ,5426 | ,64220 |
| | 95% Intervalo de Confiança | Limite inferior | -,7800 | |

| | | | |
|------------------------|-----------------|---------|------|
| para Média | Limite superior | 1,8652 | |
| 5% da média aparada | | ,4407 | |
| Mediana | | ,1505 | |
| Variância | | 10,723 | |
| Desvio Padrão | | 3,27456 | |
| Mínimo | | -4,81 | |
| Máximo | | 7,85 | |
| Intervalo | | 12,66 | |
| Intervalo interquartil | | 4,44 | |
| Assimetria | | ,525 | ,456 |
| Curtose | | -,158 | ,887 |

Tabela 44 – Testes de normalidade para as diferenças do perímetro dos “objetos” analisados.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| Perímetro Dif (T1-T0) | ,104 | 26 | ,200* | ,969 | 26 | ,609 |
| Perímetro Dif (T2-T0) | ,111 | 26 | ,200* | ,964 | 26 | ,484 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 45 - Estatística descritiva para as diferenças da área dos “objetos” analisados.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Área Dif (T1-T0) | Média | | ,1008 | ,74556 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -1,4347 | |
| | | Limite superior | 1,6363 | |
| | 5% da média aparada | | ,1382 | |
| | Mediana | | ,3335 | |
| | Variância | | 14,452 | |
| | Desvio Padrão | | 3,80164 | |
| | Mínimo | | -8,07 | |
| | Máximo | | 7,60 | |
| | Intervalo | | 15,67 | |
| | Intervalo interquartil | | 5,60 | |
| | Assimetria | | -,135 | ,456 |
| | Curtose | | -,271 | ,887 |
| Área Dif (T2-T0) | Média | | ,6263 | ,82147 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | -1,0655 | |
| | | Limite superior | 2,3182 | |

| | | |
|------------------------|---------|------|
| 5% da média aparada | ,4197 | |
| Mediana | -,0545 | |
| Variância | 17,545 | |
| Desvio Padrão | 4,18868 | |
| Mínimo | -5,17 | |
| Máximo | 10,41 | |
| Intervalo | 15,58 | |
| Intervalo interquartil | 5,31 | |
| Assimetria | ,675 | ,456 |
| Curtose | ,041 | ,887 |

Tabela 46 - Testes de normalidade para as diferenças da área dos “objetos” analisados.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| Área Dif (T1-T0) | ,066 | 26 | ,200* | ,990 | 26 | ,995 |
| Área Dif (T2-T0) | ,113 | 26 | ,200* | ,944 | 26 | ,171 |

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 47 - Estatística descritiva para o Índice de fragmentação A.

| | | | Estatística | Erro Padrão |
|----------------|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| ÍndiceFragA_T0 | Média | | ,0138 | ,00242 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | ,0089 | |
| | | Limite superior | ,0188 | |
| | 5% da média aparada | | ,0115 | |
| | Mediana | | ,0100 | |
| | Variância | | ,000 | |
| | Desvio Padrão | | ,01235 | |
| | Mínimo | | ,01 | |
| | Máximo | | ,07 | |
| | Intervalo | | ,06 | |
| | Intervalo interquartil | | ,00 | |
| | Assimetria | | 4,149 | ,456 |
| | Curtose | | 18,485 | ,887 |
| ÍndiceFragA_T1 | Média | | ,0146 | ,00138 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | ,0118 | |
| | | Limite superior | ,0175 | |
| | 5% da média aparada | | ,0140 | |
| | Mediana | | ,0100 | |

| | | | | |
|----------------|---------------------------------------|-----------------|--------|--------|
| | Variância | | ,000 | |
| | Desvio Padrão | | ,00706 | |
| | Mínimo | | ,01 | |
| | Máximo | | ,03 | |
| | Intervalo | | ,02 | |
| | Intervalo interquartil | | ,01 | |
| | Assimetria | | 1,255 | ,456 |
| | Curtose | | ,305 | ,887 |
| ÍndiceFragA_T2 | Média | | ,0135 | ,00095 |
| | 95% Intervalo de Confiança para Média | Limite inferior | ,0115 | |
| | | Limite superior | ,0154 | |
| | 5% da média aparada | | ,0133 | |
| | Mediana | | ,0100 | |
| | Variância | | ,000 | |
| | Desvio Padrão | | ,00485 | |
| | Mínimo | | ,01 | |
| | Máximo | | ,02 | |
| | Intervalo | | ,01 | |
| | Intervalo interquartil | | ,01 | |
| | Assimetria | | ,687 | ,456 |
| | Curtose | | -1,662 | ,887 |

Tabela 48 – Testes de normalidade para o Índice de fragmentação A.

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Estatística | df | Sig. | Estatística | df | Sig. |
| ÍndiceFragA_T0 | ,468 | 26 | ,000 | ,360 | 26 | ,000 |
| ÍndiceFragA_T1 | ,397 | 26 | ,000 | ,667 | 26 | ,000 |
| ÍndiceFragA_T2 | ,416 | 26 | ,000 | ,604 | 26 | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

ANEXO VII – Testes estatísticos

Tabela 49 - Teste t de Student para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada à temperatura ambiente.

| Teste de uma amostra | | | | | | |
|----------------------|--------------------|----|-----------------------|-----------------|---|----------|
| | Valor de Teste = 0 | | | | | |
| | t | df | Sig. (2 extremidades) | Diferença média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | |
| | | | | | Inferior | Superior |
| pH_Dif_T1_T0_TempAmb | -3,436 | 2 | ,075 | -,09867 | -,2222 | ,0249 |
| pH_Dif_T2_T0_TempAmb | -,249 | 2 | ,827 | -,01267 | -,2314 | ,2061 |

Tabela 50 - Teste t de Student para as diferenças dos valores de pH da amostra armazenada a 40°C.

| Teste de uma amostra | | | | | | |
|----------------------|--------------------|----|-----------------------|-----------------|---|----------|
| | Valor de Teste = 0 | | | | | |
| | t | df | Sig. (2 extremidades) | Diferença média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | |
| | | | | | Inferior | Superior |
| pH 40C Dif (T1-T0) | -17,019 | 2 | ,003 | -,46467 | -,5821 | -,3472 |
| pH 40C Dif (T2-T0) | -117,156 | 2 | ,000 | -5,48233 | -5,6837 | -5,2810 |

Tabela 51 - Resumo dos testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon, amostras emparelhadas) para os valores de viscosidade à velocidade de deformação em corte 5,027 s⁻¹ da amostra armazenada à temperatura ambiente.

| | Hipótese nula | Teste | Sig. | Decisão |
|---|---|--|------|------------------------|
| 1 | A mediana das diferenças entre postos Viscosidade_T0 e Viscosidade_T1M_TempAmb igual a 0. | Teste dos sinalizados de Wilcoxon de Amostras Relacionadas | ,109 | Reter a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,0

| | Hipótese nula | Teste | Sig. | Decisão |
|---|---|--|------|------------------------|
| 1 | A mediana das diferenças entre postos Viscosidade_T0 e Viscosidade_T2M_TempAmb igual a 0. | Teste dos sinalizados de Wilcoxon de Amostras Relacionadas | ,102 | Reter a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,0

Tabela 52 - Teste t de *Student* de amostras em pares para os valores de viscosidade velocidade de deformação em corte 5,027 s⁻¹ da amostra armazenada a 40°C.

Teste de amostras emparelhadas

| | Diferenças emparelhadas | | | | | t | df | Sig. (2 extremidades) |
|--|-------------------------|---------------|----------------------|---|-----------|--------|----|-----------------------|
| | Média | Desvio Padrão | Erro padrão da média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | | | | |
| | | | | Inferior | Superior | | | |
| Pa Viscosidade_T0 - r 1 Viscosidade_T1M_40°C | -55,41667 | 44,48234 | 25,68189 | -165,91692 | 55,08358 | -2,158 | 2 | ,164 |
| Pa Viscosidade_T0 - r 2 Viscosidade_T2M_40°C | -122,14667 | 31,26241 | 18,04936 | -199,80680 | -44,48653 | -6,767 | 2 | ,021 |

Tabela 53 – Teste t de *Student* para as diferenças do parâmetro R0.

Teste de uma amostra

| | Valor de Teste = 0 | | | | | |
|----------------|--------------------|----|-----------------------|-----------------|---|----------|
| | t | df | Sig. (2 extremidades) | Diferença média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | |
| | | | | | Inferior | Superior |
| R0 Dif (T1-T0) | -,069 | 25 | ,946 | -,00054 | -,0167 | ,0156 |
| R0 Dif (T2-T0) | -6,146 | 25 | ,000 | -,03296 | -,0440 | -,0219 |

Tabela 54 – Resumo dos testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon, amostras emparelhadas) para os valores do parâmetro R5.

| | Hipótese nula | Teste | Sig. | Decisão |
|---|---|---|------|------------------------|
| 1 | A mediana das diferenças entre R5_T0 e R5_T1 é igual a 0. | Teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de Amostras Relacionadas | ,135 | Reter a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,0

| | Hipótese nula | Teste | Sig. | Decisão |
|---|---|---|------|---------------------------|
| 1 | A mediana das diferenças entre R5_T0 e R5_T2 é igual a 0. | Teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de Amostras Relacionadas | ,004 | Rejeitar a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05

Tabela 55 - Teste t de *Student* para as diferenças do parâmetro R7.

| Teste de uma amostra | | | | | | |
|----------------------|--------------------|----|-----------------------|-----------------|---|----------|
| | Valor de Teste = 0 | | | | | |
| | t | df | Sig. (2 extremidades) | Diferença média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | |
| | | | | | Inferior | Superior |
| R7 Dif (T1-T0) | ,820 | 25 | ,420 | ,00650 | -,0098 | ,0228 |
| R7 Dif (T2-T0) | 1,903 | 25 | ,069 | ,01981 | -,0016 | ,0412 |

Tabela 56 - Teste t de *Student* de amostras em pares para os valores do volume das cavidades.

| Teste de amostras emparelhadas | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------|---------------|----------------------|---|----------|-------|----|-----------------------|
| | Diferenças emparelhadas | | | | | t | df | Sig. (2 extremidades) |
| | Média | Desvio Padrão | Erro padrão da média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | | | | |
| | | | | Inferior | Superior | | | |
| Par 1 Volume_T0 - Volume_T1 | ,14192 | ,38553 | ,07561 | -,01380 | ,29764 | 1,877 | 25 | ,072 |
| Par 2 Volume_T0 - Volume_T2 | ,15385 | ,44471 | ,08722 | -,02578 | ,33347 | 1,764 | 25 | ,090 |

Tabela 57 - Teste t de *Student* para as diferenças da rugosidade aritmética.

| Teste de uma amostra | | | | | | |
|----------------------|--------------------|----|-----------------------|-----------------|---|----------|
| | Valor de Teste = 0 | | | | | |
| | t | df | Sig. (2 extremidades) | Diferença média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | |
| | | | | | Inferior | Superior |
| Ra Dif (T1-T0) | -1,960 | 25 | ,061 | -1,37819 | -2,8262 | ,0698 |
| Ra Dif (T2-T0) | -1,478 | 25 | ,152 | -1,19619 | -2,8633 | ,4709 |

Tabela 58 - Teste t de *Student* de amostras em pares para os valores da profundidade das rugas.

| Teste de amostras emparelhadas | | | | | | | | |
|---|-------------------------|---------------|----------------------|---|----------|-------|----|-----------------------|
| | Diferenças emparelhadas | | | | | t | df | Sig. (2 extremidades) |
| | Média | Desvio Padrão | Erro padrão da média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | | | | |
| | | | | Inferior | Superior | | | |
| Par 1 - Profundidade_T0 - Profundidade_T1 | 7,46154 | 25,35386 | 4,97230 | -2,77911 | 17,70219 | 1,501 | 25 | ,146 |
| Par 2 - Profundidade_T0 - Profundidade_T2 | 8,42308 | 27,66684 | 5,42591 | -2,75180 | 19,59795 | 1,552 | 25 | ,133 |

Tabela 59 - Teste t de *Student* as diferenças do perímetro dos “objetos” analisados.

| Teste de uma amostra | | | | | | |
|-----------------------|--------------------|----|-----------------------|-----------------|---|----------|
| | Valor de Teste = 0 | | | | | |
| | t | df | Sig. (2 extremidades) | Diferença média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | |
| | | | | | Inferior | Superior |
| Perímetro Dif (T1-T0) | ,025 | 25 | ,980 | ,01388 | -1,1085 | 1,1363 |
| Perímetro Dif (T2-T0) | ,845 | 25 | ,406 | ,54262 | -,7800 | 1,8652 |

Tabela 60 - Teste t de *Student* para as diferenças da dos “objetos” analisados.

| Teste de uma amostra | | | | | | |
|----------------------|--------------------|----|-----------------------|-----------------|---|----------|
| | Valor de Teste = 0 | | | | | |
| | t | df | Sig. (2 extremidades) | Diferença média | 95% Intervalo de Confiança da Diferença | |
| | | | | | Inferior | Superior |
| Área Dif (T1-T0) | ,135 | 25 | ,894 | ,10081 | -1,4347 | 1,6363 |
| Área Dif (T2-T0) | ,762 | 25 | ,453 | ,62631 | -1,0655 | 2,3182 |

Tabela 61 - Resumo dos testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon, amostras emparelhadas) para o índice de fragmentação A.

| | Hipótese nula | Teste | Sig. | Decisão |
|---|---|---|------|------------------------|
| 1 | A mediana das diferenças entre ÍndiceFragA_T0 e ÍndiceFragA_T1 é igual a 0. | Teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de Amostras Relacionadas | ,341 | Reter a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.

| | Hipótese nula | Teste | Sig. | Decisão |
|---|---|---|------|------------------------|
| 1 | A mediana das diferenças entre ÍndiceFragA_T0 e ÍndiceFragA_T2 é igual a 0. | Teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de Amostras Relacionadas | ,675 | Reter a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.

Glossário

Ácido hialurônico: é um polissacarídeo de elevado peso molecular encontrado na matriz extracelular, especialmente no tecido conjuntivo. Várias funções fisiológicas têm sido atribuídas ao ácido hialurônico incluindo a lubrificação, a homeostase da água e a regulação da distribuição de proteínas plasmáticas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Angiogênese: desenvolvimento de novos vasos a partir de vasos sanguíneos pré-existent. É um processo fisiológico que ocorre durante a cicatrização das feridas, na ovulação e no endométrio após a menstruação.

Base: Transportador da (ou das) substância(s) ativa(s) em preparações sólidas ou semissólidas, sendo constituído por um ou vários excipientes.

Biometria cutânea: disciplina que surge da aplicação de meios biofísicos ao estudo das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele através da medição objetiva e rigorosa de determinadas variáveis, por métodos cientificamente comprovados e não-invasivos.

Complexo SNARE: complexo que inclui três proteínas, a syntaxina 1, a SNAP-25 e a sinaptobrevina. Este complexo é essencial para a libertação de neurotransmissores, desempenhando um papel fundamental na fusão de membrana para a formação e liberação do conteúdo vesicular (acetilcolina) na terminação nervosa com consequente condução de impulso nervoso para a contração muscular.

Creme: preparações multifásica de consistência semissólida constituída por uma fase lipófila e por uma fase aquosa.

Creme hidrófilo: preparação multifásicas de consistência semissólida em que a fase externa é a fase hidrófila (do tipo “óleo-em-água”).

Curare: nome comum atribuído a vários compostos venenosos naturais extraídos das plantas *Strychnos toxifera* e *Chondodendron tomentosum*, que provocam paralisia da musculatura estriada.

Encefalinas: são opióides endógenos que inibem a atividade neuronal.

Emulsão óleo-em-água: emulsão em que a fase interna é hidrófoba e a fase externa é hidrófila.

Esclerose sistêmica: é uma doença reumática crônica de causa desconhecida, caracterizada por alterações vasculares, produção de anticorpos dirigidos contra partes do próprio corpo (auto-anticorpos) e aumento da produção de tecido fibroso, quer na pele, quer em órgãos internos do corpo.

Fibronectina: é uma glicoproteína de adesão da matriz extracelular. Esta glicoproteína é um dímero com massa molecular de aproximadamente 550 kDa, desempenhando diversas interações e funções, como por exemplo, adesão e migração de vários tipos de células, formação do citoesqueleto, fosforilação da tirosina, e formação de metástases.

Film-forming: agentes que quando aplicados na pele ou no cabelo deixam sobre estes uma película flexível, coesa e contínua. Estes agentes têm propriedades de ligação à água e deixam na pele uma sensação de suavidade.

Fluido Newtoniano: é o fluido que apresenta uma razão constante entre a tensão e a velocidade de deformação.

Sintetase do ácido hialurônico: enzima responsável pela síntese de ácido hialurônico.

Lamininas: são os principais componentes das membranas basais. São glicoproteínas compostas por 3 cadeias (α , β e γ) ligadas por ligações dissulfídicas, responsáveis por influenciar a diferenciação, migração e adesão das células.

Lisil oxidase: é uma enzima extracelular dependente de cobre que catalisa a formação de aldeídos a partir de resíduos de lisina nos precursores do colagénio e elastina. Permitindo deste modo o *cross-linking* das fibras de colagénio e elastina e, portanto a estabilização das estruturas de tecido conectivo com a estabilidade e elasticidade apropriadas.

Matriquinas: péptidos com origem na matriz extracelular que resultam da quebra das proteínas dérmicas e que são capazes de regular a atividade celular.

Metaloproteinases da matriz: são endopeptidases dependentes de zinco, associadas à renovação normal dos tecidos. Degradam colagénio, fibronectina, laminina, entre outras proteínas.

Péptidos inibidores de enzimas: péptidos com a capacidade de forma direta ou indireta de inibirem enzimas existentes na pele, como sendo por exemplo as metaloproteinases da matriz.

Péptidos inibidores de neurotransmissores: péptidos que diminuem a contração muscular através de interações na junção neuromuscular.

Péptidos de sinalização: péptidos com a capacidade de aumentar a renovação dérmica através da estimulação direta dos fibroblastos dérmicos, inibindo a collagenase e aumentando a produção de substâncias fundamentais.

Péptidos transportadores: péptidos que auxiliam a entrega de cofatores à derme necessários para a cicatrização de feridas e em vários outros processos ligados à manutenção da integridade da derme.

Pseudoplástico: ver reofluidificante.

Reofluidificante: comportamento de um fluido Não-Newtoniano que se caracteriza pela diminuição da viscosidade aparente com o aumento da velocidade de corte em escoamento estacionário.

Tensão de corte: componente da tensão paralela (ou tangencial) à área considerada.

Tixotropia: propriedade que certos materiais têm de exibir uma menor viscosidade quando é aplicada uma força e, portanto, de poderem passar a um estado de maior fluidez, sem variação da temperatura, voltado ao estado primitivo logo que acaba essa ação.

Toxina botulínica tipo A: toxina produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*, que impede a contração muscular. Esta toxina é utilizada clinicamente em diversos distúrbios.

Transforming Growth Factor Beta (TGF- β): fator essencial na regulação de processos fisiológicos, tais como: proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência, angiogênese e tolerância imunológica.

Trombospondina I: proteína que se liga ao TGF- β e o torna biologicamente ativo.

Velocidade de corte: mudança da deformação de corte por unidade de tempo.

Viscosidade: representa a propriedade de um material resistir ao escoamento.

Viscosidade aparente: razão entre a tensão de corte num ponto e a velocidade de deformação correspondente, quando a relação entre ambas não é linear; o seu valor depende da velocidade de corte.

Waglerin-1: uma neurotoxina encontrada no veneno da Víbora do Templo (*Tropidolaemus wagleri*), a qual é responsável pela capacidade desta cobra em paralisar as suas presas. Esta toxina causa um antagonismo reversível dos receptores nicotínicos musculares da acetilcolina na membrana pós-sináptica, fazendo com que o músculo permaneça relaxado.